DIE FERMENTE UND IHRE WIRKUNGEN

VON

PROF. CARL OPPENHEIMER
Dr. PHIL. ET MED.

*

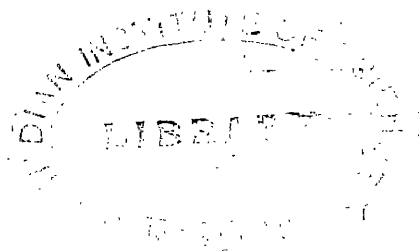
SUPPLEMENT

BAND I

(ZU Bd. I: SPECIELLER TEIL: HAUPT-TEIL VII—XII)

MIT 70 ABBILDUNGEN

1936

Dr. W. JUNK / VERLAG / DEN HAAG

VORWORT.

Eine Erneuerung der fünften Auflage meines Fermentwerkes in irgend einer Form erwies sich als notwendig. Erstens war diese Auflage, soweit es die beiden Textbände von 1925—26 anlangt, so gut wie vergriffen. Zweitens aber hat die Fermentforschung in diesen 10 Jahren auf den meisten Gebieten nicht nur Fortschritte gemacht, sondern in manchen Teilen völlige Umwälzungen erfahren. Besonders galt dies, wenn ich meinem bisherigen Gebrauch treu bleiben wollte, die reine Enzymforschung nicht isolirt zu behandeln, sondern auch die Grenzgebiete zu behandeln, nämlich einerseits die Chemie der Substrate, soweit diese noch Probleme darbieten, die auf die Erkenntnis der Fermentprozesse zurückwirken; und andererseits die Übergänge von der rein enzymtypischen Grundlegung der Lebensprozesse zu ihrer dynamischen Behandlung überhaupt, also zur dynamischen Biochemie, zur Erkenntnis der Abläufe in der lebenden Substanz im Allgemeinen und einiger Organvorgänge im Besonderen.

Auf allen diesen Gebieten sind große Fortschritte zu verzeichnen, und auf nicht wenigen Teilgebieten völlige Umwälzungen. Auf dem engeren Gebiete der Enzymologie selbst brauche ich nur erinnern an die sprunghaft einsetzende Erforschung der Phosphatasen, die in der 5. Auflage noch ein unbedeutendes Nebenkapitel darstellten; an die Umwälzungen auf dem Gebiete der Carbohydrasen und auf die völlige Umgruppirung der Gruppe der Proteasen, bedingt durch die Erkenntnis, dass erstens alle Proteasen, auch die das genuine Eiweiß angreifenden, echte Hydrolasen sind, und zweitens, daß alle Eiweiß angreifenden Gewebsfermente einer Gruppe, den Papainasen, angehören; und weiter bedingt dadurch, daß wir die Möglichkeit fanden, innerhalb der Hauptgruppe der Proteasen nun ganz scharf die Proteinasen von den Peptidasen zu trennen. Ergaben sich also auf allen diesen Gebieten neue Gesichtspunkte für die Schilderung der Enzyme an sich, so mußte die Beschreibung der Substrate und ihres Abbaus ganz neu geschöpft werden. Die Chemie der hochmolekularen Naturstoffe als Substrat der Fermente ist völlig neu erbaut worden; und so erwies es sich als notwendig, sie auch völlig neu zu schreiben.

Ganz verändert ist auch das Bild, das wir uns nun von der Natur und Wirkung der Desmolasen zu machen haben, jener Stoffwechselfermente, die sowohl den anoxybiontischen Abbau, die „Gärung" katalysiren, wie auch den terminalen oxybiontischen Abbau, die „Atmung". Wir haben nicht nur grundlegend neue und überraschende Kenntnisse über diese Enzyme selbst gewonnen, besonders über die eisenhaltigen „Fermenthämine", sondern auch ihre Bedeutung ist weitgehend aufgeklärt. Damit hat aber wieder die biologische Oxydationskatalyse ein ganz neues Gesicht erhalten, und auch diese Kapitel bedurften einer völligen Erneuerung. Und nicht anders wie mit der Theorie der biologischen Oxydation steht es mit ihrer biodynamischen Bedeutung: auch in den Kapiteln, welche den Zellstoffwechsel behandeln, den Abbau der Zucker und Aminosäuren, die Zellatmung als Gesamtproblem, mußte neu aufgebaut werden.

Mit alledem war also die innere Berechtigung einer Neubearbeitung des Ferment-

werkes gegeben; schwierig war indessen die praktische Durchführung. Am nächsten lag es, den üblichen Weg zu gehen und eine Neuauflage zu veranstalten. Dagegen sprechen aber äußere und innere Gründe. Äußere: denn diese 6. Auflage hätte selbst dann einen beinahe unerträglichen Umfang angenommen, wenn man dazu gegriffen hätte, hier und da Entbehrliches aus dem älteren Material wegzulassen. Auch dann wäre man wohl immer noch auf über 200 Druckbogen Text gekommen. So lag der Gedanke nahe, die 5. Auflage als „Hauptwerk" bestehen zu lassen, und die moderne Enzymologie in einem Ergänzungswerk als halb selbstständiges Buch zu schreiben. Es sprachen dafür aber auch sehr gewichtige innere Gründe. Das Ergebnis der letzten 10 Jahre Enzymforschung mit Einschluß der Grenzgebiete ist in den wichtigsten Teilkapiteln eine so völlige Neuschöpfung, daß man es mit einem gewissen Maß von Paradoxie sogar für besser und richtiger hinstellen kann, diese neue Lehre in sich geschlossen vorzutragen, und den Inhalt des Hauptwerkes als ebenfalls abgeschlossenes historisches Lehrgebäude bestehen zu lassen. Dieser Modus bot die Möglichkeit, das Neue und Umwälzende viel schärfer und bildhafter darzustellen, als wenn man bei jedem Teilkapitel das Neue als eine Ergänzung des Alten hätte darstellen wollen. So ist denn schließlich der Gedanke des „Ergänzungswerkes" zur Tat geworden, und ich übergebe den ersten Band dem Urteil der Fachgenossen.

Es seien dazu noch einige weitere Erklärungen vergönnt. Es ist mir von der — im übrigen sehr wohlwollenden — Fachkritik schon bei dem Hauptwerk und auch jetzt wieder vorgehalten worden, daß ich zu viel bringe, indem ich jede mir erreichbare Arbeit wenigstens erwähne. Ich kann diesen Standpunkt nicht teilen und halte an meinem Grundsatz fest. Wenn ich die Absicht habe, ein wenn auch ausführliches Lehrbuch über die Fermente zu schreiben, bin ich souverän in der Auswahl meines Stoffes. Aber dafür scheint kein Bedürfnis vorzuliegen, denn mein Lehrbuch von 1927 ist wenig verbreitet. Es liegt also doch wohl eher das Bedürfnis nach einem Handbuch vor; und ein Handbuch eines Specialgebietes muß vollständig sein, wenn man den Begriff „vollständig" wie selbstverständlich so deutet, daß es nach dem Willen vollständig ist. Der Forscher muß das gesamte Material zur Verfügung haben; es ist seine Sache, Unbrauchbares durch eingehende Kritik zu kennzeichnen. Ob irgend eine Specialarbeit einmal Wert erlangen wird, kann man nie vorher sagen; es gibt gerade in der Fermentlehre genug Beispiele dafür, daß ganz vernachlässigte Befunde später einmal Ausgangspunkt wichtiger Erkenntnisse geworden sind. Ich habe also wieder nur ganz ausnahmsweise Arbeiten bewußt weggelassen. Ich habe mich damit begnügt, Arbeiten, die mir als von geringer Wichtigkeit für das Fermentproblem erschienen, durch die Art der Behandlung und durch Wahl der Drucktypen als solche zu kennzeichnen; die Bedeutung der Arbeit an sich wird dadurch natürlich nicht betroffen. Es ist also wieder jede mir zu Händen gelangte Arbeit zitirt, und zwar, wie ich wieder ausdrücklich betonen möchte, nach dem Original. Soweit mir dieses nicht zugänglich war, ist die Quelle des Referates angegeben, womit ich natürlich die Verantwortung für irrige Angaben oder falsche Zitirung auf das Referatenblatt abwälze; meist sind die Ber. ges. Physiol. (Berlin, Springer) meine Quelle gewesen.

Ich habe aber doch nach besten Kräften versucht, dem Wunsche meiner Kritiker nachzukommen, und habe mich bemüht, in jedem Kapitel durch deutlich sichtbare kritische Zusammenfassungen dem Werk auch einen lehrbuchmäßigen Charakter zu geben. Es wird dem Benutzer somit ein Leichtes sein, zur ersten Orientirung nur diese Ausführungen zu lesen. Es ist nun selbstverständlich, daß diese einleitenden oder abschließenden Darlegungen meine persönliche Ansicht über die schwe-

benden Probleme wiedergeben. Und wenn ich mich auch redlich bemüht habe, Argumente und Gegenargumente sachlich abzuwägen, so bleibt eben eine solche Auseinandersetzung schwieriger Fragen eine subjektiv gefärbte Leistung; und so muß ich mich dann eben auch mit dem so ganz anders gearteten Vorwurf abfinden, daß ich Licht und Schatten ungleich verteilt habe. Zwischen diesen Klippen der allzu großen Vollständigkeit und allzu betonter subjektiver Einstellung muß ich mir also meinen Weg suchen.

Es liegt also nun der erste Band fertig vor. Er ist stärker geworden, als ich angenommen hatte. Das Material, das zu bewältigen war, ist noch umfangreicher gewesen, als ich schon befürchtet hatte. Die Hauptteile VII—XII umfassen im Supplement für 10 Jahre mehr Raum als im Hauptwerk: etwa 50 Bogen gegenüber noch nicht 40 Bogen. Ich werde also im II. Band erheblich kürzen müssen, und zwar nicht durch Weglassung von Einzelheiten, sondern durch strengere thematische Beschränkung, durch Weglassung mancher Grenzgebiete zur reinen Theorie einerseits, zur dynamischen Zell-Biochemie andererseits. So hoffe ich trotz alledem mit dem vorgesehenen Umfange von ca. 100 Bogen auszukommen.

Dieses Supplementwerk wird vorerst nur den „Speciellen Teil" umfassen. Für den „Allgemeinen Teil" war die Herausgabe eines Supplements praktisch unmöglich; hier kommt nur eine völlig neue Bearbeitung des Ganzen, also eine Neuauflage in Betracht. Ob und in welcher Form diese in Angriff genommen werden wird, müssen der Verlag und ich uns vorbehalten.

Meinem Freunde Dr. h. c. W. JUNK, der die große Arbeit und das große Wagnis auf sich genommen hat, dieses Werk zu verlegen, schulde ich tiefgefühlten Dank. Wenn es gelungen ist, den ersten Band in einer Zeitspanne herauszubringen, die ein Jahr kaum überschreitet, so danke ich dies seiner ständigen Hilfsbereitschaft und dem verständnisvollen Eifer, den die Druckerei N.V. Drukkerij v/h L. E. BOSCH & ZOON - Utrecht bei der Bewältigung des sehr schwierigen Satzes gezeigt hat.

Besonders zu danken habe ich endlich meinem Mitarbeiter Dr. W. ROMAN, der mich bei Hauptteil XI und XII in eifriger und verständnisvoller Weise unterstützt hat, und darüber hinaus einige (besonders gekennzeichnete) Teile nach meinen allgemeinen Anweisungen und unter meiner Kontrolle fast selbständig bearbeitet hat.

BERLIN, im August 1936. CARL OPPENHEIMER.

Inhaltsverzeichnis von Band I.

Specieller Teil

Dritte Hauptgruppe: Die Hydrolasen.

(Die Zahlen in Klammern bedeuten die Paragraphen).

Zur Einführung.

VII. Hauptteil: Esterasen.

E. Sulfatasen (295).

VIII. Hauptteil: Carbohydrasen I.

A. Allgemeines.

B. Oligasen.

C. Heterosidasen.

IX. Hauptteil: Carbohydrasen II. (Polyasen).

I. AMYLASEN (Diastasen).

A. Chemie und Aufbau der Stärke.

B. Darstellung und Eigenschaften der Amylasen.

C. Einfluß äußerer Faktoren.

D. Vorkommen und Bedeutung der Amylasen.

Seite

II. SONSTIGE POLYASEN.

A. Fructanasen.

B. Glucanasen.

C. Cytasen (Hemicellulasen).

D. Polyuronidasen.

X. Hauptteil: Nucleasen.

XI. Hauptteil: Amidasen.

A. Aminasen (Carbaminasen).

B. Acylamidasen.

XII. Hauptteil: Proteasen I.

A. Bau und Abbau der Proteine.

B. Nachweis und Bestimmung der Proteasen.

C. Peptidasen.

I

ZUR EINFÜHRUNG.

Da dieser erste Band des Ergänzungswerkes aus den im Vorwort auseinandergesetzten Gründen mit dem Speziellen Teile des Hauptwerkes beginnt, so müssen zum Verständnis der Darlegungen einige Wandlungen der allgemeinen Vorstellungen vorausgeschickt werden, insbesondere einige neue Begriffe eingeführt werden, mit denen wir nun ständig umzugehen haben werden. Es soll hier natürlich kein noch so gekürzter Abriß eines „Allgemeinen Teils" gegeben werden, sondern eben nur einige Vorbemerkungen, um das Verständnis zu erleichtern.

Wir konnten zwar schon im Hauptwerk an den verschiedensten Stellen auf die im wesentlichen von WILLSTÄTTER geschaffenen Vorstellungen über die chemische Struktur der Fermente hinweisen, aber die Dinge haben sich seitdem geklärt und vertieft, und es sind neue Namen eingeführt worden.

Nach den Auffassungen WILLSTÄTTERS (s. dazu OPPENHEIMER 1)) ist ein Ferment kein chemischer Stoff im üblichen Sinne, sondern ein Stoffsystem, bestehend aus einer spezifisch strukturirten und spezifisch wirksamen rein chemischen Gruppe, der Wirkgruppe, und einem „kolloiden Träger", an den die Wirkgruppe nicht nur irgendwie mechanisch verankert, sondern durch chemische Valenzen gebunden ist, gleichgiltig ob man diese Valenzen nun „Nebenvalenzen" oder „Adsorptionsbindung" nennen will, was unentscheidbar ist und vorläufig auf dasselbe hinauskommt.

Beide Teile sind absolut unentbehrlich für das aktive Ferment. Ohne die Wirkgruppe fehlt jede spezifische Affinität zu dem entsprechenden Substrat, und ohne den Träger wirkt das Ferment ebenfalls überhaupt nicht, sei es, daß es sich rein chemisch betrachtet zersetzt, oder daß die Bindungsfähigkeit an das Substrat erloschen ist. Dies führt uns hier zu weit, da wir ja hier nur die Begriffe erläutern wollen. Es besteht also das **eigentliche System Enzym** aus einer **Wirkgruppe** und einem **dazugehörigen Träger kolloider Natur.** Beide Zusätze zu dem Wort „Träger" sind von entscheidender Wichtigkeit.

Erstens ergibt sich aus dieser Begriffsbestimmung, daß man die ganz allgemeine Definition des Fermentes nunmehr so fassen muß, daß der kolloide Charakter des Trägers bereits darin festgelegt ist. Dies ist von HALDANE 2) betont worden, und ich (l. c. 1) habe mich dem angeschlossen. **Ein Enzym ist ein kolloider Katalysator biologischer Provenienz.** Dadurch ist es möglich, nicht kolloide Katalysatoren, wie sie ebenfalls im Zellgeschehen eine Rolle spielen, von der Definition als Ferment abzusondern, was sehr wichtig und fruchtbringend ist. Besonders gilt dies für die nicht enzymatischen Zwischenkatalysatoren des desmolytischen Abbaus.

Ebenso wichtig ist aber der Hinweis darauf, daß es sich um einen „zugehörigen" Träger handeln muß. Es wird dadurch zunächst theoretisch (experimentell ist es leider noch nicht möglich) ein scharfer Trennungsstrich gezogen zwischen dem eigentlichen

---

1) ***Carl Oppenheimer,*** Tierische Fermente, Allgemeines. Hb. der Bioch. Erg. Werk. Bd. 1, 384. Jena 1933. — 2) ***J. B. S. Haldane, K. G. Stern,*** Allg. Chemie der Enzyme, Dresden 1932.

Abgeschlossen: 5. Mai 1935. Ber. Phys. 84, H. 5/6.

zum System gehörigen Träger und den an Masse selbst in den reinsten Enzympräparaten anscheinend noch immer überwiegenden kolloiden rein accessorischen Begleitstoffen. Diese spielen sicherlich keine wesentliche Rolle bei der Wirkung, wohl aber können sie wichtig sein für die Stabilität des Fermentes; ferner für sein Reagiren auf äußere Einflüsse: ph, Gifte etc.

WILLSTÄTTER zog diese Konsequenz vor allem aus seinen Arbeiten über **Lyo- und Desmoenzyme.** Er fand, daß das System Enzym in ganz verschiedenartiger Weise, mehr oder minder fest, in mechanischer oder mehr chemischer Bindung weiter verankert ist an Proteine oder Proteinsysteme der Zelle selbst („Protoplasma"), und daß auch in den Lösungen der Fermente in ganz verschiedener Weise neben dem eigentlichen Träger noch allerlei Begleitstoffe, „Schlepper des Enzyms", vorhanden sind **(3)**. Um diese beiden kolloiden Systeme auch in der Benennung zu trennen, schlägt WILLSTÄTTER 4) vor, das eigentliche System, also bestehend aus Wirkgruppe und zugehörigem Träger neu zu benennen als **Symplex.** Dies soll aussagen, daß zwar hier wahre chemische Bindungen zwischen Wirkgruppe und zugehörigem Träger gegeben sind, daß es sich aber nicht um echte „Komplexbindung" im Sinne WERNERS handelt, sondern um etwas Neues und Andersartiges, um Bindungen an kolloide Körper durch deren besondere Nebenvalenz- oder Adsorptionsbindungen.

In einer theoretisch ungemein wichtigen Arbeit hat nun kürzlich KRAUT 5) gezeigt, daß zwischen diesem Träger und der Wirkgruppe wahrhafte Gleichgewichte herrschen. Es ist auch hier wieder, wie sich ja immer wieder herausstellt, gleichgiltig, ob man vom Massengesetz ausgeht oder von den Adsorptionsgesetzen. Jedenfalls ist die Verbindung Wirkgruppe—Träger sozusagen dissociabel, und eine Stabilität des ganzen Systems nur gegeben, wenn ein Überschuß des Trägers vorhanden ist. KRAUT führt dazu zwei neue Namen ein: Er bezeichnet die Wirkgruppe als **Agon**, die Trägersubstanz als **Pheron** (von *agein* herbeiführen, *pherein*, tragen), beide zusammen bilden den Symplex. Wird die — ja immer vorhandene — Wirkgruppe durch zu weitgehende Ablösung vom Träger z. T. inaktiv, so verringert sich die Wirkung. Ebenso kann natürlich eine primäre Umwandlung des Agons zur Inaktivität führen, das Agon wird zum Anagon. Es besteht ein Gleichgewicht:

$$k = \frac{[\text{Agon}]\,[\text{Pheron}]}{[\text{Symplex}]},$$

wobei k als nicht sehr klein anzusehen, das System also deutlich dissociiert ist. Bedingt das richtige Gleichgewicht die Wirkung des Enzyms, so ist seine Stabilität davon abhängig, daß ein erheblicher Überschuß an freiem Pheron vorhanden ist. Dies ist also z.B. bei Leber-Lipase der „stabilisirende Faktor" (§ 262).

Diese Ausführungen KRAUTS werfen nun ein gewisses Licht auf die Frage der „Begleitstoffe". Wie schon aus allen Ausführungen WILLSTÄTTERS implicite hervorging, sind diese nicht alle von gleicher Dignität. Man kann zunächst einmal die wirklich ganz zufälligen, für die Fermentwirkung in jeglicher Hinsicht gleichgiltigen Begleitstoffe aussondern, die „Schlepper" des Enzyms, die zum großen Teil durch die üblichen Reinigungsmethoden entfernbar sind. Sie haben Bedeutung nur indirekt, indem sie durch Gifte beeinflußbar sind, den ph verschieben u. dgl.

---

3) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Enzyme der Leucocyten. Zs. phys. Chem. **203**, 189. **204**, 181; **209**, 32; **221**, 13 (1931/3). — 4) ***Dies.***, Zustand des Glykogens etc. ebda. **225**, 103 (1934) — 5) ***H. Kraut, W. v. Pantschenko-Jurewicz,*** Struktur u. Eigensch. der Esterasen. Bioch. Zs **275**, 114 (1934) S.A.

Auf der anderen Seite steht der eigentliche Symplex, ein chemisch durch ein Gleichgewicht Pheron + Agon definirtes System. Er ist das „Enzym selbst". Um diesen herum war es aber immer schon nötig, „Begleitstoffe" mit betonter Wichtigkeit für die Fermentwirkung anzunehmen, also Stoffe, die im Weiteren zum eigentlichen „System" des Fermentes gehören, und die man also nicht so ohne Weiteres ohne tiefgreifende Änderungen beseitigen kann — oder überhaupt nicht beseitigen kann, ohne das System an sich zu zerstören. Diese — leider nur qualitative und gedankliche — Unterscheidung zwischen accessorischen und wesentlichen Begleitstoffen findet nun durch KRAUT eine schärfere Präzisierung. Zur Stabilität und definirten Wirkung des Systems im engsten Sinne (Symplex) gehört also sicherlich noch ein „weiteres System"; und wenn KRAUT Recht hat, und dieses weitere System nichts anderes ist als überschüssiges Pheron, so vereinfacht dies die Betrachtung; aber unbedingt nötig ist es nicht, und KRAUT selbst deutet die „Aktivirung" durch unspecifisches Albumin ja derart, daß dies nun als „Pheron-Ersatz" eintritt und neuen Symplex mit vorher trägerlosem Agon bildet. Die Hauptsache ist, daß der Symplex eingebettet ist in ein weiteres System, das noch wesentlich für die Enzymwirkung ist, also abzutrennen von den ganz nebensächlichen Stoffen des „Milieus".

Auf solche Vorstellungen werden wir immer wieder zurückgreifen müssen; zur Einführung der Grundbegriffe mögen hier diese Andeutungen genügen.

VII. Hauptteil.

Esterasen*)

EINLEITUNG.

§ 261. Wir haben wieder wie im Hauptwerk den Namen Esterasen für eine Hauptgruppe der Fermente gewählt und verstehen darunter sämtliche Enzyme, welche die Fähigkeit haben, die Spaltung von Estergruppen zu katalysieren, d.h. aller Gruppen, die eine Kombination von — organischen oder anorganischen — Säuren mit alkoholischen oder phenolischen Hydroxylgruppen darstellen, im Gegensatz zu den — nicht so benannten — „Aetherasen", welche die Kuppelung zweier nicht einer Säuregruppe zugehörigen Hydroxyle lösen, und zu denen alle Carbohydrasen gehören; und im Gegensatz zu den die Verbindung — C—N — lösenden Amidasen.

Diese Nomenclatur der Esterasen als Hauptgruppe wäre an sich sehr einfach und sozusagen zwangsläufig, wenn nicht die schon alte Konfusion bei der Unterteilung der Gruppe störend dazwischen träte. Anstatt Esterasen nur als Hauptbegriff anzuerkennen, womit sich dann die weitere Unterteilung nach der Art der gespaltenen Ester von selbst ergäbe, hält man vielfach noch daran fest, als **„Esterasen"** auch solche Enzyme zu benennen, die Ester niederer Fettsäuren einerseits, einwertiger Alkohole andrerseits zerlegen. Man stellt sie damit in einen Gegensatz zu den klassischen **„Lipasen"**, denen man nur die Hydrolyse der Glyceride zuerkennen will. Es ist aber nicht zulässig, denselben Namen als Oberbegriff und für einen Sektor zu führen, und abgesehen davon ist überhaupt eine eigene Bezeichnung für die „Enzyme der einfacheren Ester" undurchführbar, weil zwischen den häufig noch so benannten „Esterasen" etwa tierischer Organe und den „Lipasen" (etwa des Pankreas) ein zur Klassifikation genügender Definitionsunterschied eben tatsächlich nicht besteht. Diese Enzyme sind gruppenidentisch; und wenn man „Esterasen" wie billig als Oberbegriff festhält, so tut man am besten, die Untergruppe der Fermente, welche die Ester einfacher Carbonsäuren mit ein- oder mehrwertigen Alkoholen spalten,

---

*) Neuere zusammenfass. Darst. **1)**, **2)**.

1) ***Eug. Bamann***, Tier. Lipasen. Hb. der Bioch. Erg. Werk. Bd. **I**, 422. Jena 1933. — 2) ***P. Rona*** u. ***R. Ammon***, Stereoch. Spez. der Esterasen etc. Erg. Enzymforsch. **II**, 50. Leipzig 1933.

einheitlich als Lipasen zu bezeichnen; ohne eine gewisse systematisirende Willkür geht es ja in der Enzymlehre nur selten ab. Ich disponiere also wie im Hauptwerk, aber mit einigen Änderungen, um der inzwischen erheblich gestiegenen Bedeutung derjenigen Enzyme gerecht zu werden, die Ester mit anorganischen Säuren zerlegen: der nunmehr selbständig gewordenen Gruppen der Phosphatasen und Sulfatasen. Es ergibt sich also folgende Einteilung:

Esterasen organischer Ester

A. **Lipasen** umfassen alle Enzyme, welche die Ester einfacher ein- oder mehrwertiger Alkohole mit Carbonsäuren einfacherer Natur zerlegen. Sie umfassen also sowohl die Enzyme, die man auch als „Esterasen" zu bezeichnen pflegt (etwa Methylbutyrat als Substrat), wie die sog. echten „Lipasen", die Fette angreifen, wie auch die Zwischenstufen, die Monoglyceride angreifen, z.B. etwa die auch besonders benannte „Monobutyrinase".

B. Sehr nahe verwandt damit sind weitere Enzyme, welche die Fettsäuren aus den Phosphatiden abspalten (**Lecithasen**) und die Ester des Cholins zerlegen (**Cholin-Esterasen**).

C. Organische Esterasen anderen Typs sind **Tannase** und **Chlorophyllase**.

Esterasen anorganischer Ester

D. **Phosphatasen** zerlegen organische Ester der Phosphorsäure. Ihre Zahl und Spezifitätsgrenzen sind noch umstritten; sicherlich gibt es aber weniger, als man früher annahm. Ein Enzym zerlegt Glycerophosphate und alle Zuckerphosphate, auch die in den Nucleinsäuren enthaltenen. Selbständig ist jedenfalls die **Phytase**, sehr wahrscheinlich auch die Adenyl-pyro-phosphatase, und auch die — auch anorganische Pyrophosphate aufspaltende — Pyrophosphatase. Von der gewöhnlichen Phosphatase gibt es zwei verschiedene Typen, die nebeneinander vorkommen.

E. **Sulfatasen** zerlegen eine Reihe von organischen Estern der Schwefelsäure, so der Phenole, der Zucker u. a.

A. Lipasen.

Wir setzen uns also bewußt über alle Versuche hinweg, innerhalb dieser Gruppe neue Einteilungsprinzipien außer der nach dem Vorkommen zu suchen und behandeln alle hierhergehörigen „Esterasen", „Monobutyrinasen", „echte" Lipasen zusammen. Die nachfolgenden Ausführungen werden dieses bereits im H. W. begründete Einteilungsprinzip weiter stützen.

Eine Frage anderer Art ist nun die, ob es innerhalb dieser so gebildeten Gruppe der Lipasen nötig ist, die „echten" Lipasen von einfachere Ester spaltenden Enzymen zu trennen. Nach dem heutigen Stand der Kenntnis gibt es kein Enzym dieser Gruppe, das nur echte Fette oder nur einfachere Ester zerlegt: es handelt sich stets um Abstufungen in der relativen Spezifität. Das wird nicht dadurch widerlegt, daß

nach WILLSTÄTTERS 3—17) Forschungen diese Unterschiede in der relativen Spezifität sehr groß sein können. Es hat auch mit der definitorischen Abgrenzung nichts zu tun, wenn wir zu der Überzeugung gelangen, daß es unter den Lipasen verschiedene Enzymgruppen gibt, verschieden zum mindesten durch das System, also den eigentlichen Träger (Pheron) im Symplex; wenn nicht gar durch die Wirkgruppe an sich (Agon).

Und endlich würde es auch keine grundsätzliche Umformung der Begriffe bedeuten, wenn es den immer wiederholten Versuchen gelänge, in einem Fermentpräparat getrennt zwei Typen: „Esterase" und „Lipase" nachzuweisen. Bisher ist dies nur für Serum (wo es angesichts der besonderen Verhältnisse wahrscheinlich ist) einigermaßen gelungen. Neuerdings wird es auch für Pankreaslip. behauptet (17a), vgl. § 271. So können wir unter Wiederholung der letzten im H.W. citirten Angaben WILLSTÄTTERS c.s. vorläufig folgende Gruppen unterscheiden:

Ganz isoliert steht die Phytolipase aus höheren Pflanzen; sie bildet ein bisher nicht in Lösung zu bringendes System, das ganz betont auf Glyceride wirkt. Dagegen sind die Lipasen der Mikroben wie stets mehr den tierischen Enzymen verwandt.

Unter den tierischen Lipasen treten deutlich zwei Gruppen hervor: Organlipasen und Pankreaslipase. Erstere wirken betont auf niedere Ester, letztere auf Glyceride. Zur Pankreaslipase gehören noch die L. des Fettgewebes und der Frauenmilch; die des Darms schließt sich an die Leberlipase an. Sie unterscheiden sich aber auch, — und zwar, was sehr ins Gewicht fällt, in weitgehend gereinigten Präparaten — in Bezug auf Haltbarkeit, Aktivirung, Hemmung, asymmetrische Spaltung etc. Hier liegen also zweifellos verschiedene Systeme vor (8). Pankreaslipase ist bei allen Tieren stets dasselbe Enzym (6). Zwischen beiden steht die Magenlipase, bei der trotz aller zunächst in die Augen fallenden Differenzen WILLSTÄTTER 7) zu dem Urteil gelangte, daß diese sämtlich auf die Begleitstoffe zurückzuführen seien, und *„daß für die Annahme der Verschiedenheit von Magenlipase und Pankreaslipase der untersuchten Tierart keine Stütze geblieben ist"*.

Bei aller Gleichförmigkeit der Eigenschaften zwischen Pankreas- und Magenlipase hat WILLSTÄTTER einen Unterschied aufgefunden, wie er exakt beobachtet noch nie

3) ***R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Memmen***, Best. d. pankr. Fettspaltung. Zs. phys. Chem. **125**, 93 (1923). — 4) ***R. Willstätter*** und ***E. Waldschmidt-Leitz***, Üb. Pankreaselip. Zs. phys. Chem. **125**, 132 (1923). — 5) ***R. Willstätter*** und ***Fr. Memmen***, Stalagmom. Best. der lipatischen Tributyrinhydrolyse. Zs. phys. Chem. **129**, 1 (1923). 6) ***R. Willstätter*** und ***Fr. Memmen***, Wirk. der Pankr. Lip. auf versch. Substrate. Zs. phys. Chem. **133**, 229 (1924). — 7) ***R. Willstätter*** und ***Fr. Memmen***, Vergl. von Magenlip. mit Pankr. Lip. Zs. phys. Chem. **133**, 247 (1924). — 8) ***R. Willstätter*** und ***Fr. Memmen***, Vergl. von Leberesterase mit Pankr. Lip. Zs. phys. Chem. **138**, 216 (1924). — 9) ***R. Willstätter, F. Haurowitz, Fr. Memmen***, Spez. der Lipasen aus verschied. Organen. Zs. phys. Chem. **140**, 203 (1924). — 10) ***R. Willstätter***, Konfigur. Spezif. der Lip. Sitz. Ber. Bayr. Akad. Wiss. **1924**, 1. — 11) ***R. Willstätter, H. Kumagawa***, Takaesterase. Zs. phys. Chem. **146**, 151 (1925). — 12) ***R. Willstätter, E. Bamann***, Magenlipase. Zs. phys. Chem. **173**, 17 (1928). — 13) ***R. Willstätter, R. Kuhn, O. Lind, Fr. Memmen***, Hemmung der Leberesterase durch Ketocarbonsäureester. Zs. phys. Chem. **167**, 303 (1927). — 14) ***R. Willstätter, E. Bamann, Joh. Waldschmidt-Graser***, Konfigur.-Spezif. der Esterasen etc. Zs. phys. Chem. **173**, 155 (1928). — 15) ***H. Kraut*** und ***H. Rubenbauer***, Leberesterase. Zs. phys. Chem. **173**, 103 (1928). — 16) ***R. Willstätter, R. Kuhn, E. Bamann***, Asymm. Esterhydrolyse, Ber. Chem. Ges. **61**, 886 (1928). — 17) ***E. Bamann***, Konfig. Spez. der Leber-Esterase versch. Tiere. Ber. Chem. Ges. **62**, 1538 (1929). Weitere Arbeiten BAMANNS s. § 269. — 17a) ***P. Wolvekamp, K. Griffioen***, Lipasewirk. des Pankreassekr. Zs. phys. Chem. **223**, 36 (1934).

bei analogen Enzymen gefunden worden ist, nämlich in der Stärke der Wirkung. Die Magenlipase scheint an sich, als System, nicht infolge geringerer Konzentration desselben Systems, ca 100 mal schwächer zu sein als die des Pankreas im gleichen (eiweißfreien) Reinheitszustand. Für diese Erscheinung gibt es noch keine Erklärung; nur vermutungsweise kann man eine höhere Dispersität des Pankreasenzyms annehmen.

Es ist also letzten Endes eine reine Definitionsfrage, ob wir nun z.B. Pankreas- oder Leberlipase als „verschiedene Enzyme" betrachten, ebenso Leberlipase vom Schwein und Leberlipase von anderen Tieren. Daß die chemisch strukturell bedingte „Wirkgruppe" verschieden ist, darüber können wir zwar nichts Bindendes aussagen, aber es ist sehr unwahrscheinlich (s. u.); und so ist es Sache der Begriffsbestimmung, ob wir Enzyme „verschieden" nennen wollen, wenn das spezifische Trägersystem verschieden ist. Denn soweit dürfen wir nach den Befunden an Reinenzymen wohl gehen: es ist der spezifische Enzymkomplex verschieden, nicht bloß das äußerliche „Milieu", d. h. die zufällig mit in das Präparat gelangten Begleitsubstanzen. Wir können grundsätzlich diejenigen Stoffe, mit denen die Wirkgruppe im „Symplex" (WILLSTÄTTER) steht, nicht entfernen, ohne die Stabilität zu zerstören, und nach der heute geltenden Definition ist eben dieser ganze Symplex das Enzym. In diesem Sinne sind sie also verschiedene Enzyme; jedoch kann ein Fortschritt der Methodik (Freilegung der Wirkgruppe mit dem kolloiden Träger im engsten Sinne) diese „Verschiedenheit" ohne weiteres wegwischen. Dafür daß die Wirkgruppe identisch ist, spricht indirekt ein Befund von VIRTANEN 17[b]). Wenn man bei einem Tier Pankreaslipase intravenös einführt, so wird die Lipase in der Leber anscheinend durch Speicherung auf das Doppelte erhöht; aber dies Enzym ist eben Leberlipase; d. h. es wird die Wirkgruppe der Pankreaslipase auf das „Lebersystem" umgeschaltet, die gesamte Leberlipase wird einheitlich: Hemmung durch Atoxyl, Resistenz gegen Chinin etc. Über die Bedeutung der Begleitstoffe für die spezifische Wirkung s.a. FALK 17[c]), der sich die Sache freilich etwas zu leicht macht. Denn nur die Begleitstoffe sind wichtig, die zum System gehören, nicht aber irgend ein „Milieu" von fremden Proteinen oder dgl.

Wie das zu deuten ist, darüber gibt die neue Arbeit von KRAUT c.s. über Leberlipase (l. c. 23) in gewissem Maße Auskunft. Die Leberlipase ist deswegen stabil, weil sie im Verhältnis zum Agon sehr viel freies Pheron enthält. Diesen Überschuß kann man — durch Adsorption an Kieselgur, welche die gesamte aktive Gruppe festhält — in Lösung erhalten. Umgekehrt enthält die — nach Verdünnen mit Wasser — labile Pankreaslipase viel Symplex und wenig freies Pheron. KRAUT gelang es nun, durch Zusatz von freiem Pheron aus Leberlipase zu frischer Pankreaslipase diese auf „Leber-Esterase" umzuschalten: die Wirkung auf Methylbutyrat ließ sich verdoppeln; es wird die Leberlipase tatsächlich neu gebildet, nicht etwa nur aktivirt. Auch der umgekehrte Weg, Umbildung von Leberlipase in Pankreaslipase ist möglich, durch Mischung von an Pheron verarmter Leberlipase mit Pankreas-Glycerin-Extrakten (Zunahme der Tributyrinspaltung). Die Versuche VIRTANENS sind also so zu deuten, daß die Pankreasl. in der Leber Pheron aufnimmt, da es dort zur Bereitung von Leberl. natürlich reichlich vorhanden ist.

17[b]) ***A. I. Virtanen c. s.*** Ident. der Lip. versch. Herkunft. Acta Chem. Fenn. B. V, 28 (1932); ***ders. c. s.***, Lip. im Tierorg. Zs. phys. Chem. **219**, 1 (1933). 17[c]) ***K. G. Falk***, Direct infl. in biol. syst. Jl. of biol. chem. **96**, 53 (1932).

Damit ist aber auch für Leberlipase die Grundanschauung WILLSTÄTTERS gesichert, daß alle Lipasen dieselbe Wirkgruppe enthalten, und sich nur durch Eigenarten des Trägers unterscheiden.

I. Zoolipasen.

I. DARSTELLUNG, EIGENSCHAFTEN, WIRKUNGEN.

1) Darstellung.

§ 262. Noch mehr als bei den meisten anderen Fermenten — wenigstens den „frei secernierten" — hat die Schwierigkeit des Materials bei der Handhabung der älteren Methoden hier den wirklichen Sachverhalt verdunkelt. Erst WILLSTÄTTER und seine Schule haben auch hier die Grundlagen moderner Forschung geschaffen. Wie oben erwähnt, führen die Arbeiten zu drei chemisch und physikochemisch verschiedenen Typen von Zoolipasen: Pankreaslipase, Organlipasen; dazwischen stehend Magenlipase. Methodik bei WALDSCHMIDT-LEITZ H.W. Bd. III, S. 700.

Darstellung von Pankreaslipase aus der mit Aceton-Aether getrockneten Drüse (4) (bereits im H.W. gegeben).

Ergänzt sei noch, daß das Verhalten der Pankreaslipase gegen saure resp. basische Adsorbentien nicht sehr spezifisch ist; sie wird von beiden aufgenommen, immerhin ist sie saurer als Amylase und Trypsin, so daß zur Trennung basische Adsorbentia dienen (Tonerde aus 0,01 n. essigsaurer Lösung; Elution NH_3 oder Alkali-phosphat). Die WILLSTÄTTERsche Methode liefert ein Präparat, das frei ist von Amylase und Proteasen. Eine unvollkommene Trennung kann man durch Ultrafiltration erzielen (LAGRANGE 18). Die naheliegende Annahme, man könnte das reine Pankreassekret mit Vorteil als Ausgangsmaterial benutzen, trifft nach WALDSCHMIDT-LEITZ 19) nicht zu, da die Konz. wesentlich niedriger ist als in den Auszügen aus getrockneter Drüse.

Magenlipase: WILLSTÄTTER trocknete den aus der Schleimhaut von Schweinemagen erhaltenen Brei in Aceton, dann Aceton-Aether. Aus dem Pulver kann man das Ferment am besten mit N/40 NH_3 ausziehen; durch Einstellen der Extrakte auf ph = 4,7 stabilisiren. Nach Zusatz von Glycerol bei 15° im Hochvakuum eindampfen. Reinigung durch Zusatz von Essigsäure; das ausfallende Mucin reißt 85 % des Enzyms mit. Elektrodialyse nach Auflösen in N/40 NH_3 gegen Essigsäure, Enzym flockt aus. Wiederauflösen in NH_3. Adsorption durch Kaolin, Elution mit glycerinhaltiger Ammoniumphosphatlösung. Bei den Reinigungsprozessen werden Hemmungskörper beseitigt, so daß die Gesamtausbeute ca. 130 % beträgt, trotz aller Verluste bei der Reinigung. Der Glycerol-Rohextrakt enthält aber an sich nur 40—600 mal weniger Lipase als der des Pankreas.

Diese Reinigung führte dazu, daß beim Schweinemagen das Präparat 125 mal so stark wirkte als der getrocknete Magen, 25 mal so stark als die getrocknete Schleimhaut. Durch weitere Reinigung (12) kam WILLSTÄTTER zu Präparaten mit einer Wirksamkeit von 3000,

---

18) ***E. Lagrange, E. Suarez,*** Ultrafiltr. des f. pancr. Soc. Biol. **96**, 963 (1927). — 19) ***E. Waldschmidt-Leitz c. s.,*** Enzym. Wirkung von Pankr.- und Darmsekret. Zs. phys. Chem. **166**, 247 (1927).

resp. 600. Das Mittel hierzu ist eine Verdauung der aus der Schleimhaut stammenden mucinhaltigen Proteine mit Hefenprotease bei ph = 6,8. Diese wird vorgenommen nach Wiederauflösung der Essigsäure-Fällung in n/40 NH_3, indem man 10—20 cm^3 Hefenautolysat auf 0,3—0,4 g. Trockensubstanz zufügt. Nach der Verdauung ergibt Ansäuern einen winzigen Niederschlag, der 50—70 % der Lipase enthält. Wiederauflösung in NH_3, dann häufige Adsorption mit Kaolin, abwechselnd mit Tonerde.

Blutlipase haben Rona und Petow **20)** aus den mit Ammonsulfat ausgefällten Globulinen mit Glycerol extrahiert.

Leberlipase **(8)** kann man zwar sehr reichlich mit Glycerol extrahiren, aber dann schwer weiter reinigen. Willstätter trocknet die Leber mit Aceton und extrahirt mit sehr verdünntem NH_3; dann folgt einmalige Fällung mit Kaolin oder $Al(OH)_3$, dann Elektrodialyse. Damit wird eine Anreicherung auf das 40fache des getrockneten Organs erzielt, weiter ist mit der Adsorptionsmethode nicht zu kommen. Man muß nach Kraut und Rubenbauer **15)** erst die Rohextrakte dialysiren, wobei eine Fällung von Eiweiß erfolgt.

Bei Verwendung von Hammeldarm treten nur geringe Enzymverluste auf; bei Pergamentpapier erhebliche, anscheinend durch Weggang des stabilisirenden Trägers (§ 263). Dann folgt Adsorption in n/100 Essigsäure an Kaolin, dann an Tonerde, wobei hauptsächlich Begleitstoffe entfernt werden. Nach dem Eindampfen im Hochvakuum unter besonderen Kautelen folgen weitere Adsorptionsprozesse; sie müssen nach den einzelnen Präparaten etwas modificirt werden, so daß eine allgemeine Vorschrift ganz exakt nicht gegeben werden kann. Es sei nur gesagt, daß z.B. nach dem Eindampfen folgen: Tonerde, Kaolin, Elution, Tonerde, Elution.

Ergebnis bei den besten Präparaten das 128fache des getrockneten Organs, **Esterasewert 114**. Für reaktionskinetische Prüfungen genügt nach Bamann **17)** Extraktion des Trockenorganes mit N/40 NH_3, Ansäuern mit Essigsäure und Dialyse gegen aq. dest.

Das Verfahren der Wahl ist für Leberlipasen indessen die Autolyse, wie dies zuerst mit leidlich gutem Erfolge von Kosterlitz und Petow **21)** versucht worden ist. Wesentlich verbessert wurde es auf Grund der neu gewonnenen Erkenntnisse über die Verankerung des Enzyms in der Zelle (§ 263) von Bamann c.s. **22)**. Sie stellten fest, daß eine weitgehende Freilegung des Enzyms bei der üblichen Autolyse (saure Reaktion) nicht eintritt, daß vielmehr eine alkalische Autolyse nötig ist.

Wenn man auf die 1 g Trockengewicht entsprechende Menge Frischleber 20 ccm n/20 NH_3-Lösung anwendet, oder 100 ccm n/40, so erhält man in 10—14 Tagen 90 % der Lipase freigesetzt. Doch ist diese Zeit zu lang, ferner das Autolysat schwer zu filtrieren. Am besten erwies es sich, nach 3—4 Tagen mit verd. Essigsäure anzusäuern, wobei Eiweißballast ausfällt, und das glatte Filtrat oder Zentrifugat das gesamte Enzym enthält. Bei Dialyse wird eine weitere Menge von Ballaststoffen entfernt, die z.T. wegwandern, z.T. unwirksam ausfallen. So wird eine 10 fache Anreicherung des Rohenzyms gegenüber Frischleber erzielt.

Weitere wesentliche Fortschritte bringt die auch sonst bedeutungsvolle, bereits

---

20) ***P. Rona*** und ***H. Petow***, Weit. Unt. über die Giftempfindl. von Lip. etc. Biochem. Zs. **146**, 144 (1924). — 21) ***H. Kosterlitz*** und ***H. Petow***, Verh. der Esterase bei der Autol. der Leber. Biochem. Zs. **175**, 31 (1926). — 22) ***E. Bamann, J. N. Mukherjee, L. Vogel***, Isolier. der Esterase aus der Leber. Zs. phys. Chem. **229**, 15 (1934) S.A.

mehrfach erwähnte Arbeit von KRAUT c.s. 23). Sie zeigten, daß man die langdauernde und unbequeme Dialyse ersetzen kann durch eine einmalige Voradsorption der Rohextrakte mit Bleiphosphat (Zusatz von Ammoniumphosphat und Bleiacetat zur Lösung). Dabei werden dieselben Ballaststoffe entfernt wie bei der Dialyse und den ersten Voradsorptionen mit Kaolin und Al-hydroxyd. Esterasewert 23—35. Zweite Voradsorption ebenso mit Bleiphosphat. E.W. 50—65. Hauptadsorption mit sehr genauer Dosierung des Adsorbens, da sonst erhebliche Verluste eintreten, wieder mit Bleiphosphat, dann Elution (n/10 Essigsäure) führte zum bisher wirksamsten Präparat mit **E.W. von 166.**

Da die verschiedenen Adsorptionsmethoden je nachdem die Aktivität und die Stabilität beeinflussen, die unabhängig von einander sind — es können schon recht mäßig wirksame Präparate (E.W. 40) instabil sein, während das oben genannte wirksamste Präparat ziemlich stabil ist — so ergibt sich, daß die Adsorbentia bald energischer den ganzen Symplex, resp. das Agon, bald das freie Pheron festhalten, welch letzteres maßgeblich ist für die Stabilität. Kaolin und besonders Kieselgur adsorbieren bevorzugt das Agon, so daß man durch Kieselgur eine Lösung bekommt, die weitgehend von Agon und Symplex befreit, also an sich kaum noch wirksam ist, aber reichlich Pheron enthält. Mit dieser kann man Leberlipasen aus Pankreasl. künstlich herstellen (§ 261). Umgekehrt beseitigt aus vorgereinigten Lösungen Bleiphosphat weitgehend das Pheron, so daß man instabile Lösungen bekommt (§ 263).

2) Eigenschaften.

§ 263. Wie bei Enzymen überall, soweit hochgereinigte Präparate überhaupt schon hergestellt sind, müssen wir unterscheiden zwischen den Eigenschaften, die man an diesen bis aufs Letzte von allem nicht zum System gehörenden Ballast befreiten Präparaten erkennen kann, und den Bildern, welche die üblichen etwas gereinigten Präparate aufweisen. Ganz zu trennen ist das natürlich nicht, man muß da etwas schematisieren.

Löslichkeit und Beständigkeit: In jeder Form ist L. klar löslich in Wasser und in Glycerol, sobald sie einmal von ihrem Sitz in der Zelle losgetrennt ist, als Lyolipase (s. u.) auftritt. Von der Art des Systems hängt nun die Beständigkeit ab: Pankreaslipase ist nur in Glycerol beständig, allenfalls in Aceton, geht in Wasser, Alkohol, Glykol schnell zu Grunde.

Demgegenüber ist Seruml. in ihrem natürlichen Milieu lange haltbar (PERSIEL 24); sie kann sogar durch Spontanaktivirung wirksamer werden (§ 266a). Sehr eigenartig sind die Verhältnisse bei der Leberlipase. An sich ist sie sehr beständig, wenigstens beim Warmblüter. CAILLET 25) fand sie in Glycerin nach 13 Jahren erhalten, während Nierenl. halb zerstört war. Dagegen gibt KERNOT 26) für die Karpfenleber an, daß die L. sogar bei —4° sehr schnell inaktivirt wird, innerhalb einer Woche auf $^1/_6$ Wirkung sank; ähnlich die des Hodens. Diese Beständigkeit des Warmblüterferments gilt auch für gereinigte Präparate (l. c. 8), aber sie ist nicht ein Attribut des eigentlichen Fermentsystems, sondern bedingt durch einen besonderen, biuretgebenden Stabilisator (KRAUT c. s. l. c. 15); wenn man diesen durch besondere Reinigungsprozesse entfernt,

---

23) ***H. Kraut, W. v. Pantschenko-Jurewicz,*** Struktur und Eigensch. der Esterasen. Bioch. Zs. **275**, 114 (1934) S.A. — 24) ***H. Persiel,*** Ü. Serumest. u. Pankr.-Lip. Diss. München 1925 (cit. n. 1). — 25) ***O. R. Caillet,*** Stabil. of esterase etc. Proc. Soc. Exp. Biol. **28**, 357 (1930). — 26) ***J. C. Kernot, H. W. Hills,*** Lip. aus versch. Organen des Karpfens. Zs. phys. Chem. **208**, 33 (1932) S.A.

wird das Enzym noch labiler als Pankreasl.; es verliert in 24 h 50 % seiner Aktivität. Es beruht also auch hier die Dauerexistenz des Systems „Enzym" auf dem Schutz durch seine normalen ihm zugehörigen Träger-Substanzen im weiteren Sinne, die ohne zum letzten eigentlichen Träger zu gehören, zwar nicht für die Aktivität, aber eben für die Stabilität unumgänglich nötig sind.

Für diese bisher in allgemeinen Umrissen, mehr qualitativ als quantitativ zu deutenden Verhältnisse gibt nun KRAUT c.s. (l. c. 23) eine ins Einzelne gehende Erklärung, die als Arbeitshypothese hochbedeutsam ist. Der stabilisirende Faktor ist nicht nur bei der Leberlipase vorhanden, wo er näher als ein biuretgebender tyrosinreicher Eiweißabbaustoff charakterisirt werden konnte, sondern bei allen Lipasen, aber je nach der Loslösung aus der Zelle und der Vorbehandlung mehr oder minder ausreichend. Es ist kein dritter essentieller Stoff, der sich noch zu Agon und Pheron addirt, sondern es ist das „freie", d. h. nicht im Gleichgewichtszustand mit dem Agon im Symplex gebundene Pheron selbst. Dieser Überschuß bewirkt eine Stabilität des Gleichgewichtes $\frac{[\text{Agon}]\ [\text{Pheron}]}{[\text{Symplex}]}$ in dem Sinne, daß möglichst wenig freies Agon vorhanden ist, das empfindlich ist und sich in unwirksames Anagon umwandelt. Entfernt man den Überschuß, so tritt Instabilität auf.

So ist Pankreaslipase nur in Glycerol beständig, bei Verdünnung mit Wasser fällt ein Proteinniederschlag aus, und die in Lösung verbleibende L. ist höchst labil geworden. Dagegen hat Leberl. auch in ihrer Lösung einen gewaltigen Überschuß an freiem Pheron, ist also sehr stabil; sie wird erst dann instabil, wenn man ihr diesen Überschuß künstlich entzieht, wobei Bleiphosphat das wirksamste Agens ist; auch die Eluate mit n/10 Essigsäure aus Bleiphosphat sind häufig instabil, weil anscheinend das Pheron nicht nur stärker adsorbiert, sondern auch stärker festgehalten wird als der ganze wirksame Symplex.

So kommt es, daß Wirksamkeit und Stabilität nicht reciprok sind, wie man namentlich im Anfang der WILLSTÄTTERschen Forschungen vielfach anzunehmen geneigt war, in dem Sinne, daß man hochgereinigte, d. h. hochwirksame Präparate grundsätzlich als instabil ansah. Die Wirksamkeit ist eine Funktion des gesamten Symplexes, die Stabilität des überschüssigen Pherons. Nur dann, wenn man zu viel Pheron entfernt, wird das Symplexgleichgewicht gestört, und es sinkt auch die Wirksamkeit. So zeigt sich auch bei Leberlipasen, daß je nach der Vorbehandlung mäßig wirksame Präparate (E.W. 40) instabil sein können, sehr hochwertige stabil.

Aus den Verschiedenheiten der einzelnen Lipasen folgert KRAUT, daß das jeweilige Pheron nicht irgend ein genuinesProtein ist, sondern ganz bestimmte organspezifische kolloide Stoffe, wohl Eiweißabbauprodukte, die sich allerdings in gewissem Umfange vertreten können, wie dies ja bei anderen Enzymen (z.B. Urease) auch der Fall ist.

Es sei vorausschauend bemerkt, daß auch Albumin vikariirend für den genuinen Träger eintreten kann. Ob Albumin als chemischer Stoff oder ein Begleitstoff des Albumins, bleibt dabei natürlich offen. Jedenfalls deutet KRAUT die Aktivirung durch Albumin bei Pankreaslipasen (§§ 264, 267) indirekt als eine Synthese neuen Ferments durch Aufbau von Symplex aus dem überschüssig vorhandenen Agon, wobei das Albumin direkt als Pheron eintritt. Dies gilt besonders für die sehr hoch aktivirbare Lyolipase aus Pankreas, bei der BAMANN (l. c. 34) Wirkungszunahmen bis zu 9000 % durch Albumin + Ca - Oleat gefunden hat. In den Auszug aus frischen Drüsen geht neben dem Symplex viel überschüssiges Agon hinein, das nun mit dem Albumin neuen Symplex bildet. — Über die Bedeutung des Pheron im KRAUTschen Sinne bei Giftwirkungen s. §§ 265a ff.

Diese Gedankengänge, die sich ohne wesentliche Änderungen auf andere Enzyme übertragen lassen, dürften wesentlich dazu beitragen, unser Bild von der Natur und Wirksamkeit der Enzyme zu klären, und besonders auch die immer wieder auftauchenden Fragen nach der „Verschiedenheit" der Enzyme in ihrer Bedeutung zu vermindern. Wenn wir „verschiedene", aber sehr nahe verwandte Enzyme grundsätzlich als Symplexe mit gleichem Agon und leicht verschiedenem, art- und organspezifischen Pheron ansehen dürfen, so werden manche dieser Probleme eine einfache Deutung gefunden haben, besonders bei den Carbohydrasen.

An den nicht oder wenig gereinigten Präparaten ist folgendes beobachtet:

Die L. des Darmsaftes wandert nach REALE 27) (I) anodisch bei ph 8,3 bis 5,0, unter 4,5 kathodisch, ihr isoel. Punkt liegt demgemäß bei ca. 4,7. Aus der ph-Aktiv.-Kurve läßt sich die Dissoc. Konstante zu ca. $2{,}9 \times 10^{-7}$ berechnen.

Die Diffusibilität spricht für ein ziemlich grobdisperses Kolloid. In Übereinstimmung mit älteren Angaben fand GYOTOKU 28), daß verschiedene L. schon durch relativ grobporige Ton-Filter (CHAMBERLAND L 1) zurückgehalten werden, nicht durch BERKEFELD. Tierische Membran ist undurchlässig (l. c. 15); durch Pergament geht etwas hindurch, vielleicht aber nur der oben erwähnte Stabilisator, so daß der Enzymverlust indirekt zu deuten ist.

Die Fällbarkeit durch eiweißfällende Agentien schwankt ebenfalls mit der Art des Präparates und dem Grade der Reinigung. Immerhin zeigen ungefähr übereinstimmende Angaben von GYOTOKU 28) und BAMANN 29) bei verschiedenen L., daß sie jedenfalls nur zum kleinsten Teil mit den Globulinen bis Halbsättigung mit Ammonsulfat ausfallen, die Hauptmenge fällt erst mit den Albuminen, nach BAMANN mehr als 80 %.

Alles dies gilt natürlich nur für Präparate des Enzyms in halbgereinigtem Zustande, wenn also das eigentliche Enzymsystem noch weiter verbunden ist mit sekundären Trägersubstanzen, die in der Hauptsache Proteine sind, so daß alle diese äußerlichen Reaktionen eben nur als Reaktionen der begleitenden Eiweißkörper zu betrachten sind. BAMANN c. s. 29) haben sogar in einem Zufallsbefund einmal ein lipatisch wirksames Proteinkristallisat erhalten, das an die kristallisirten Ureasen und Proteinasen von SUMNER und NORTHROP erinnert.

Das ändert sich nun aber vollständig, wenn man durch hochgesteigerte Reinigungsprozesse nach Möglichkeit die nebensächlichen Trägersubstanzen entfernt, d. h. ungefähr das System auf den eigentlichen Träger + Wirksubstanz zurückführt, wie dies bei den reinsten Präparaten gelungen ist, wenn die Reinigung eine ca. 300 fache, bei Magenl. 600 fache Wirksamkeit gegenüber der getrockneten Schleimhaut erreicht (l. c. 3, S. 94). Diese Reinpräparate geben teils gar keine, teils schwache Proteinreaktion, keine Kohlenhydratreaktion, viel Asche, N-Gehalt ca 10 %. Die nach den letzten Verbesserungen erhaltenen Lipasepräparate aus Magen und Leber geben weder Millon-, noch Biuret-, noch Tryptophanreaktion. Dem entspricht, daß Proteasen nicht einwirken (WILLSTÄTTER), so daß man ja sogar intensive proteolytische Verdauung zur Freilegung der Lipase verwenden kann (s. o.).

Auf die widersprechenden Befunde FALKS 30), daß Trypsin bei ph = 7 die Lipasewirkung herabsetzt, Papain wechselnd wirkt und sogar — bei Triacetin — steigern soll, ist demgemäß kein Gewicht zu legen; er arbeitet ja wie immer mit Rohextrakten.

---

27) ***L. Reale***, Esterasi del secr. enter. I—III. Arch. di farm. **56**, 512 (1933) S.A.; Boll. Soc. Ital. Biol. **7**, 1930, **8**, 1622. Atti Soc. Sci. Med. Cagliari **1933**. H. 5. S.A. — 28) ***K. Gyotoku, S. Terashima***, Lipase V, Biochem. Zs. **217**, 292 (1930). — 29) ***E. Bamann, P. Laeverenz***, Pankr. Lyo- und Desmolipasen. Zs. phys. Chem. **223**, 1 (1934) S.A. — 30) ***K. G. Falk***, Effects of proteases on lip. act. Jl. of Biol. Chem. **103**, 363 (1933).

Bleibt somit die Natur des spezifischen kolloiden Trägers noch im Dunkeln, so hat neuerdings auf Grund von Modellversuchen LANGENBECK **31)** begründete Annahmen über die Natur der **Wirkgruppe** gemacht. Es scheint sich bei den Lipasen um „aktivirte" Alkohole zu handeln, die anscheinend Hauptvalenz-Affinitäten zu den Fettsäuren ausüben. Z. B. zeigt Benzoylcarbinol als Katalysator der Fettspaltung genau dieselben Spezifitäten wie Enzyme vom Esterase-Typus.

Auf die theoretischen Grundlagen der LANGENBECKschen Vorstellungen, daß eine bestimmte Gruppe eines Katalysators die aktive Gruppe (Wirkgruppe) ist, eine andere im Molekül, die aktivirende, ihn erst zu einem richtig wirksamen Katalysator macht, wird hier nicht eingegangen. Hier nur das Tatsächliche: die aktive Gruppe des einen Ester zerlegenden Katalysators ist die — CH_2OH-Gruppe, die sich an die Fettsäure bindet und so die Hydrolyse vollzieht, als zweites Stadium zerfällt dann die Fettsäure-Katal.-Verbindung. Bei sehr langsamen Esterspaltungen wirken auch schon gewöhnliche Alkohole beschleunigend, für die Modelle der Esterase kommen aber nur besonders aktivirte in Betracht. Das Modell muß inbezug auf Kinetik und Spezifität dem Enzym sehr ähnlich wirken, und dies ist der Fall z. B. bei Benzoylcarbinol, bei Oxy-acetophenon-4-carbonsäure. Anzweiflung dieser Befunde OLIVIER **31a)**; Replik LANGENBECK.

Ein „Lipasemodell" ganz anderer Art will BOLAFFI **32)** aufgefunden haben. Nach ihren Angaben spalten Peptone bei ph = 7 Tributyrin u.a. Glyceride. Gifte hemmen wie bei Lipasen. Proteine sind ohne Wirkung, durch Hydrolyse bis zu einem gewissen Grade wird das lipolytische Agens wirksam. Auch GALWIALO **33)** will eine schwache lipatische Wirkung auf Pflanzenöl von Peptonen gesehen haben, sowie von Leucin und Glutaminsäure, andere Aminosäuren sind unwirksam (gegenüber den alten Befunden von FALK und NELSON (H.W. *l. c. 16*) *).

Lyo- und Desmolipasen; natürliche Hemmungskörper. Auf die grundsätzlichen Anschauungen WILLSTÄTTERS über die verschiedenen Zustände der Enzyme in den Zellen, ihre mehr oder minder weitgehende Verankerung an die Zellkolloide, das „Protoplasma", und die Möglichkeiten der Isolirung werden wir erst im Zusammenhang bei den Amylasen, dem Hauptversuchsobjekt WILLSTÄTTERS eingehen. Hier seien nur die tatsächlichen Feststellungen wiedergegeben, die entsprechend dieser Grundvorstellung BAMANN **34, 35)** bei der Pankreas- und Leberlipase gemacht hat.

BAMANN fand, daß ganz frische Pankreasdrüse nur winzige Bruchteile an Lyolipase freigibt, wenn man mit reinem Glycerol extrahirt. Dabei ist es gleichgiltig, ob die Drüse roh oder schnell getrocknet ist: die guten Ausbeuten WILLSTÄTTERS aus getrockneter Drüse sind nicht auf Rechnung des Trocknens an sich, sondern der mit diesen Prozeduren verbundenen autolytischen Zerfallprozesse zu setzen. Es gehen nur 0,1—3 % des Gesamtenzyms heraus, der Rest ist hier also Desmolipase. Überläßt man aber die Drüse einige Zeit sich selbst, so entsteht immer wieder neue Lyolipase. Aber diese neu entstehenden Lyolipasen sind von der ersten und voneinander verschieden, wie dies ja auch bei den Amylasen der Fall ist, die sich chemisch unterscheiden. BAMANN unterscheidet sie vor allem durch die Aktivirbarkeit. Die volle „ausgleichende Aktivirung" (mit Albumin, $CaCl_2$ und Oleat) ergibt bei der ersten in

*) Anm. Die cursiv gesetzten Zahlen entsprechen Zitaten aus dem Hauptwerk (H. W.)

31) ***W. Langenbeck*** und ***Jos. Baltes***, Esterase-Modelle — Strukturspezif. der Esterase-Modelle. Ber. Chem. Ges. **67**, 387, 1204 (1934), **68**, 776 (1935). — 31a) ***S. C. J. Olivier***, Modèles d'estérase. Rec. Trav. Chim. **54**, 322 (1935). — 32) ***A. Bolaffi***, Az. lipas. dei peptoni. Arch. di Sci. Biol. **19**, 277 (1933). BPh **78**, 485. — 33) ***M. J. Galwiolo***, ***L. J. Simina***, Einige lipol. Syst. Bioch. Zs. **238**, 24 (1931). — 34) ***E. Bamann***, ***P. Laeverenz***, Pankr. Lyo- und Desmolip. Zs. phys. Chem. **223**, 1 (1934) S.A. — 35) ***E. Bamann***, ***J. N. Mukherjee***, Protoplasm. Verankerung der Leberesterase. Zs. phys. Chem. **229**, 1 (1934) S.A.

frischem Zustande extrahirbaren L. eine Wirkungssteigerung von 5000—9000 %, während der Drüsenrückstand, also reine Desmolipase, nur um einige 100 % aktivirt werden kann. Dazwischen liegen nun die Werte für die nach einiger Zeit frei gewordenen Lyolipasen. Diese stellen also andere Systeme dar, als die erste Fraktion. Die Lyolipasen sind eben nach KRAUT (l. c. 23) viel ärmer an Pheron und deswegen weitgehend in an sich unwirksamem, aber aktivirbarem Zustande.

Die Lyolipasen bilden kontinuirliche Reihen inbezug auf die Eigenschaften der kolloiden Trägersubstanzen, während bei den Amylasen scharfe Grenzziehungen möglich sind, die wohl mit der Art der Wirkungsgruppe zusammenhängen. Außerdem liegt aber bei der Lipase der Fall insofern anders, als eben durch Autolyse oder auch durch organische Lösungsmitel (Aceton, Aether) immer wieder neue Mengen Lyolipase frei werden, während bei Amylase und etwa ebenso bei Trypsin alles das, was überhaupt Lyo-Enzym ist, mit der ersten Extraktion gewonnen werden kann. Denn Desmo-Enzyme werden überhaupt nicht spontan frei, auch nicht durch Autolyse, da sie mit dem Protoplasma chemisch verankert sind; sie können erst — wenn überhaupt — durch aktive chemische Eingriffe losgelöst werden. Die verschiedenen Lyolipasen haben also auch noch verschiedene Trägersysteme, und diese Unterschiede lassen sich auch nicht gänzlich durch volle Aktivirung beseitigen, was die specifische Wirkung anlangt; es sind die Reaktionskonstanten für verschiedene Substrate auch dann noch wechselnd verschieden, es zeigen sich da besonders Unterschiede zwischen Präparaten aus getrockneten und nicht getrockneten Drüsen, die wieder zum großen Teil auf die Einwirkung der beim Trocknen benutzten, die Systeme verändernden organischen Lösungsmittel zu beziehen sind.

Ganz ähnlich liegen die Dinge bei der Leber. Auch hier ergibt das frische Organ nur 1 % Lyolipase, extrahirbar mit reinem Glycerol. 30—40 % kann man mit Wasser-Glycerolmischungen herausbekommen, den Rest langsam mit alkalischen Lösungen, schnell bei Verknüpfung mit Autolyse (Methode der Gewinnung von Leberenzym, l. c. 22). Wesentlich befördert wird die Freilegung durch Überführung in Aceton-Trockenpräparate.

Diese Versuche — ebenso wie die vorhergehenden an anderen Zellenzymen — beginnen allmählich etwas Licht über die Grundlage zu verbreiten, in welchem Zustande sich die Enzyme in der lebenden Zelle befinden und damit, mit welchem Maß von Recht und Wahrscheinlichkeit wir die frei dargestellten Enzyme als Abbilder der natürlichen Enzyme betrachten dürfen. Danach sind jedenfalls alle Enzyme durch recht erhebliche Nebenvalenzkräfte an das Kolloidsystem der Zelle — Eiweiß + Lipoide — gebunden. Die Lockerung durch oberflächenaktive Stoffe beruht z. T. auf einer Aufhebung der Lipoid-Eiweißbindung, z. T. auf einer Dispersitätsverminderung durch Koagulation; jedenfalls sind die Kräfte zwischen Enzym und kolloidem Zellsystem nachher geringer, nähern sich dem Ausmaß der „Adsorptionskräfte"; die Autolyse dagegen wirkt umgekehrt erst auf die innerhalb der Proteine wirksamen Hauptvalenzen: sie verkürzt die Ketten durch wahrhaften Abbau, und die so entstehenden kürzeren Ketten haben nur noch geringere Nebenvalenzkräfte, um das Enzymsystem festzuhalten (BAMANN).

Noch weiter kompliziert werden die Verhältnisse dadurch, daß nun natürlich auch noch die bereits in Lösung gegangenen L. nicht etwa auch nur annähernd reine Enzymsysteme sind. Auch in diesen Lösungen finden sich noch allerlei Stoffe, die z. T. wohl gänzlich nebensächlich sind, z. T. aber wieder Bedeutung für die Enzymwirkung haben, sei es eine günstige, etwa als zusätzliche Stabilisatoren, z. T. eine ungünstige,

weil sie irgendwie durch Verminderung der Affinität zum Substrat die Wirkung herabsetzen, mag man dies nun auf Adsorption oder auf Nebenvalenzbindungen beziehen; wir sind solchen Hemmungskörpern im System der verschiedenen Lipasen bereits im H.W. vielfach begegnet und werden sie auch hier ständig berücksichtigen müssen, wenn wir die komplizierten Verhältnisse der „inaktiven" L. und ihrer „Aktivirung" schildern (§ 267). Hier sei nur noch die Beobachtung von DYCKERHOFF c.s. **36)** angeführt, daß auch aus Pankreas die L. in Gemeinschaft mit einem proteinartigen Hemmungsstoff extrahirt wird, wenn man Glycerol, Wasser oder ganz schwaches Alkali zur Extraktion verwendet, nicht Säure. Dieser Hemmungsstoff wird ziemlich schnell extrahirt, so daß die ersten Anteile an L. am schwächsten wirken. Koagulation der Enzymlösung mit Aceton-Aether beseitigt den Stoff, so daß die so erhaltenen Trockenpräparate bis neunmal so wirksam sind als die Lösung.

3) Bestimmung der Wirksamkeit.

§ 264. Zu den bisherigen auf der direkten Titration der gebildeten Fettsäuren oder auf der Oberflächenspannung (RONA und MICHAELIS) beruhenden Methoden sind noch folgende hinzugekommen:

Bei der einfachen Titration der neugebildeten Säure empfiehlt GLICK **37)** nicht wie bisher direkt mit Alkali zu titriren, weil CO_2 der Luft Fehler bedinge, sondern mit einem alkalischen Puffer (Glycin-NaOH, ph = 8,7) zu arbeiten und dann mit Säure zu titriren. (Bromthymolblau als Indikator, ph = 6,5). Differenz gegen eine Titration vor der Wirkung ergibt die neugebildete Säure.

RONA **38)** hat zur Bestimmung der Lipase in Geweben etc. eine gasometrische Methode ausgearbeitet: die freiwerdenden Fettsäuren treiben CO_2 aus Bicarbonat aus, der steigende Gasdruck wird gemessen. Ferner haben RONA und KLEINMANN **39)** nach Spaltung einer Emulsion von Triolein das verbleibende Subtrat nephelometrisch gemessen (KLEINMANN, H.W. Bd. III, 726). GOZONY **40)** benutzt die Ausflockung von Caseinogen aus zugesetztem Na-Caseinat bei ph = 5,6 durch die gebildete Säure, und Schätzung der Trübung zu einem Verfahren annähernder Bestimmung. HERZFELD **40[a])** hat eine Methode angegeben, um aus der Abnahme der Trübung bei Tributyrin L. zu bestimmen.

Die dilatometrische Methode GALEOTTIS (1912), (Messung von Volumänderungen während der Reaktion s. RONA, AMMON **41)**) ist nicht in allen Fällen brauchbar, weil die Puffer selbst an den Volumänderungen teilnehmen. Neues Dilatometer ohne Hahn AMMON **42)**.

Ausführungsform der stalagmometrischen Methode l. c. 5; neue Apparatur bei KRIJGSMANN **43)**. Ablehnung der Methode und Empfehlung der direkten Messung der Oberflächensp. in erg/cm² nach der Maximalblasendruckmethode mit dem REHBINDERSCHEN Apparat WWEDENSKY **44)**; noch andere Methode zur Messung der OFSp. LEJHANEC **45)**.

Für reaktionskinetische Untersuchungen kommt die direkte kolorimetrische Beobachtung der freiwerdenden Säure unter Zusatz eines Indikators ohne Puffer nach E. KNAFFL-LENZ in Betracht, indem man durch Zusatz von Alkali die Flüssigkeit immer am Umschlagspunkt

---

36) ***H. Dyckerhoff, H. Miehler, V. Tadsen,*** Adsorpt. von Enz. an Eiweiß. Biochem. Zs. **268,** 17 (1934). S.A. — 37) ***D. Glick,*** Mikrometh. zur Best. des lipol. F. Zs. phys. Chem. **223,** 252 (1934), sowie engl. C. R. Lab. Carlsberg **20,** 1 (1934). — 38) ***P. Rona, A. Lasnitzki,*** Best. der Lip. etc. Biochem. Zs. **152,** 504, s. a. **172,** 82, **178,** 207. — 39) ***P. Rona, H. Kleinmann,*** Substratdispers. und Ferm.-Wirk. ebd. **174,** 18 (1926). — 40) ***L. Gozony, F. Hoffenreich,*** Lipasetitr. Verf. ebd. **204,** 126; **208,** 259 (1929). — 40[a]) ***E. Herzfeld,*** Einf. Meth. zur Best. von Lip.-Wirk. Mikrochemie **15,** 227 (1934); BPh **83,** 638. — 41) ***P. Rona, R. Ammon,*** Enz. Esterhydrol. etc. Biochem. Zs. **249,** 446 (1932). — 42) ***R. Ammon, H. Bartscht,*** Dilatom. Meth. bei Esterbild. ebd. **268,** 331 (1934). — 43) ***B. J. Krijgsman,*** Stalagmom. bepaling van lipasen. Naturw. Tidschr. **10,** 137 (1928). — 44) ***N. Wwedensky c. s.,*** Best. der lipol. Wirk. Bioch. Zs. **188,** 448 (1927). — 45) ***G. Lejhanec,*** Esterase peritonéale. Soc. Biol. **118,** 1231 (1933). BPh **75,** 238.

hält. E. BAMANN c. s. 46) haben auf Fehlerquellen dieser Methode (Hemmung durch die Indikatoren etc.) hingewiesen, nach deren Ausschaltung diese Methode erst für die exakte und quantitative Bestimmung der fettspaltenden Enzyme brauchbar ist. P. RONA und R. AMMON 47) verwenden elektrometrische Titration; modificirt (l. c. 41).

Messung der Wirkung. Mit den beiden ersten Methoden hat nun WILLSTÄTTER c. s. (l. c. 3) eine Reihe vergleichender Bestimmungen ausgearbeitet, die gestatten, ganz verschiedene Präparate von Lipasen auf ihre Wirksamkeiten zu prüfen, also relative Enzymkonzentrationen zu finden. (Vgl. dazu auch UMSCHWEIF 48); Grenzen der Methodik für die Handelspraxis s. a. STEUDEL 49). Die Grundlage ist, daß man die Enzympräparate wegen der Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Verteilung und den Begleitstoffen in zum Vergleich geeignete Systeme bringen muß; dies geschieht durch ausgleichende Aktivirung (Über die Grenzen dieser Ausgleichung s. a. BAMANN l. c. 34). Spaltung bei anfangs alkalischer, dann saurer Reaktion; beginnend mit ph = 8,9 (NH_3 — NH_4 Cl-Puffer), bei 24 % Verseifung ist ph = 5,5; Aktivirung durch $CaCl_2$ + Albumin (s. u.) wird so intensiv vorgenommen, daß sie an sich maximal ist, d. h. daß die natürlichen Begleitstoffe keinen diesbezügl. Einfluß mehr ausüben.

Bei Spaltung der Fette alkalimetrische Bestimmung der Fettsäuren. Die Spaltung verläuft bis zu 25 % etwa parallel der Fermentmenge, darüber hinaus verläuft die Kurve flacher; Messung soll also zwischen 10 und 24 % Spaltung erfolgen (l. c. 3, S. 114). Bei starker Verdünnung (Blut, Magen) Tributyrinspaltung: Modifikation der stalagmometrischen Methode durch Zusatz eines Aktivatorsystems von Albumin, CaCl und Na-Oleat bei ph = 8,6 (l. c. 5). Ferner hat WILLSTÄTTER noch Triacetin und Methylbutyrat zum Vergleich herangezogen, um an der Hand der verschiedenen Spaltungsgeschwindigkeiten die Spezifität, dh. die Existenz mehrerer Fermente zu prüfen.

Lipaseeinheit (L.E.). Menge Lipase, die in 13 ccm Ammon-Ammonchloridpuffer bei ph 8,9 + 10 mg $CaCl_2$ und 15 mg Albumin bei 30° in 1 h 24% von 2,5 g Olivenöl spaltet. (Entspricht 0,01 g einer bestimmten Pankreasprobe).

Lipaseeinheit für die Tributyrinspaltung ist diejenige Menge, die unter den bestimmten Bedingungen die Abnahme der Tropfenzahl der Tributyrinlösung in 50 Minuten um 20 bewirkt, d. h. etwa die Hälfte der Differenz zwischen den Tropfenzahlen von reiner Tributyrinlösung und von Wasser (Butyraseeinheit = B.E.). B.E. ist beim Schweinepankreas = ca. 0,001 L.E., bei Pferdepankreas und Schweinemagen ca. 0,002 L.E.

Lipasewert. Anzahl der L.-E. in 0,01 g einer Substanz. Die höchsten Lipasewerte waren 207, 209, 240.

Bei der Methylbutyratprobe wird die Lipaseeinheit als L'.-E. bezeichnet. Auch hier geschieht die Bestimmung nach maximaler Aktivierung (Ca-Oleat, eventuell noch Albumin) bei ph = 8,9. Eine L'.-E. ist diejenige Menge, die in 20 ccm eines Ansatzes (0,8 g Methylbutyrat, 75 Teile eines gleichen Gemisches von 87 %igem Glycerol und Wasser, 20 Teile NH_3 — NH_4Cl-Puffer auf 100 aufgefüllt) enthalten ist und in 60 Minuten 25 % des Esters spaltet. Sie ist bei demselben Präparat etwa gleich 1 L.E. (etwas mehr, 1,2.).

Ganz analog wird mit Triacetin gemessen. Das Ferment wird hierbei durch das

---

46) ***E. Bamann c. s.,*** Einfluß der Indikatorfarbstoffe auf das Wirkungsvermögen der Esterasen. Zs. phys. Chem. **194,** 1 (1931). — 47) ***P. Rona, R. Ammon,*** Zur stereochem. Spezif. der Lipasen usw. Bioch. Zs. **181,** 48 (1927). — 48) ***B. Umschweif,*** Lipasebest. in Ferm.-Präp. Bioch. Zs. **249,** 75 (1932).

Substrat + Puffer schnell geschwächt, nach 100 Minuten bereits um 90 %! Lange Versuche sind also nicht möglich. Die Triacetin-Lipase-Einheit L''-E. hat wieder dieselbe Größenordnung wie L.-E. und L'-E.

Kritik der Methode STEUDEL 49), als auf einem Irrtum beruhend zurückgewiesen 50), Replik STEUDEL. Andere weniger empfehlenswerte Verfahren sind:

a) die Messung im alkalischen Medium (ph = 8,9) unter Zusatz von Albumin und Calciumchlorid. Die entstehende Säure macht zur Konstanthaltung der h größere Puffermengen erforderlich, die reinere Präparate schädigen. Daher ist sie auf reinere Präparate nicht anzuwenden.

b) die Bestimmung in konstant saurem Gebiet (ph = 4,7) unter ausgleichender Hemmung mittels Albumin.

Bei den Magenlipasen (außer Schwein) ist eine exakte Vergleichung der B.-E. mit der des Pankreas noch nicht möglich, da hier bei den Messungen der natürliche Einfluß der grade vorhandenen Begleitstoffe noch nicht durch ausgleichende Aktivirung ausgeschaltet werden konnte. Hier wird also bisher nur eine scheinbare Lipasemenge B.-(e) gemessen, indem die gemessene Tropfenzahl mit einer normalisierten Pankreaslipase verglichen wird. (WILLSTÄTTER l. c. 9). Auch Leberlipase wird ohne ausgleichende Aktivirung stalagmometrisch bestimmt, da sie im natürlichen Milieu aktivirt ist.

4) Einwirkung äußerer Faktoren.

§ 265. Zwischen den einzelnen Lipasen herrschen nicht nur in Bezug auf die selektive Wirkung, sondern auch auf die Förderung resp. Hemmung auf den ersten Blick sehr weitgehende Differenzen vor. Es ist indessen heute sichergestellt, zuerst durch WILLSTÄTTER (l. c. 8), dann auch durch RONA c. s. in den unten aufzuführenden Vergiftungsstudien, sowie durch BAMANN 51), daß hier nicht verschiedene, d. h. durch die essentielle Wirkgruppe oder den essentiellen Träger verschiedene Enzyme, sondern nur verschiedenartige Begleitstoffe für die Verschiedenheiten verantwortlich sind, sowie verschiedene Zustände, wie Alter, ph, auch die Art des Substrates.

Über **physikalische Einflüsse** ist nicht viel berichtet worden.

Bezgl. der **Temperatur** gilt nach wie vor als Optimum ungefähr 40°; bei Darml. hat REALE (l. c. 27) 37°, bei Serumlipase JANTRIA 53) 45° gefunden, bei *Helix* KUNTARA (l. c. 72) ca. 35°. Tötungstemp. im Sinne EULERS bei Darml. 53°, der Inaktivir. Koeff. K_c steigt von 35—53° für 24 h von 10 auf 410 $\times 10^{-3}$ (l. c. 27). Bei Trockenpräparaten (Pankreasl.) starke Abnahme über 100°, Erlöschen bei 135°, bis auf eine geringe synthetische Wirkung, die aber wohl nichts mehr mit dem Enzym zu tun hat, sondern direkte Reaktion (Ölsäure + Glycerol) ist (DI FRISCO 54).

Die normale (chininempfindliche) Seruml. (Hund) ist bei 50° fast resistent, 54° in 5′ verringert um 20 %. 65° in 10′ um 50 %, 70° zerstört schnell. Geringe Schwankungen der einzelnen Sera (Pferd) um 68° herum (GRUZEWSKA 55)). Eine angeblich gleichzeitig vorhandene chininresistente L. ist viel empfindlicher (DI MACCO 56)).

Das ph-Stabilitätsoptimum gegen Erwärmen liegt bei gereinigter Pankreasl. bei ph = 6,0 (50 % Glycerol) sowohl bei Rohauszug, wie bei Reinpräparaten, stimmt also mit dem Reaktionsopt. nicht überein (MAC GILLIVRAY 57)).

---

49) ***H. Steudel,*** Quantit. Ferm.- Best. (Lipase) ebd. **268**, 231; **269**, 175 (1933/4). — 50) ***E. Waldschmidt-Leitz c. s.,*** (Lipase) ebd. 268, 178 (1934). — 51) ***E. Bamann, P. Laeverenz,*** Über den Einfl. von opt. akt. Fremdstoffen auf die Konfig. Spezif. der Leberesterase verschied. Reinheitsgrades. Zs. phys. Chem. **193**, 201 (1930). — 53) ***E. Jantria,*** Veloc. di reaz. della lip. in funz. d. temp. Riv. di. pat. sper. **2**, 370 (1927). — 54) ***S. di Frisco,*** Az. lipolit. . . . di estratti di pancr. Arch. di fisiol. **24**, 70 (1926). BPh **37**, 883. — 55) ***Z. Gruzewska c. s.,*** Infl. de la temp. sur . . . lip. Soc. Biol. **113**, 11; BPh **74**, 344. — 56) ***G. di Macco,*** Az. del calore s. sierolip. Riv. di Pat. Sper. **1**, 448; BPh **41**, 123. — 57) ***J. H. Mac Gillivray,*** Inact. of pancr. lip. by heat. Bioch. Jl. **24**, 891 (1930).

Abgeschlossen: 5. Mai 1935. Ber. Phys. 84, H. 5/6.

Licht hemmt (Gegensatz zu AZUMA **58**), aber U. V. nur bei leicht saurer Reaktion (ph = 5,9) **(59)** und am besten nach Ausfällung eines Teiles des Eiweißes, das schützend wirkt.

Bei der Bestrahlung ganzer Tiere (Kaninchen) wird die Leberlipase geschädigt auch durch U.V., während die Herz- und Leberlip. auch durch hochkerziges Glühlicht vermindert werden; hier scheinen langwellige oder Wärmestrahlen wirksam zu sein (**60**). Nach KEESER **61)** wirkt monochromatisches Licht stets fördernd, am besten ist das Bereich von 4700—4300 Å, die Wirkung nimmt mit Dauer der Bestrahlung zu.

Radon (Emanation) hatte auf Seruml. (*Cavia*) in Dosen von ca. 8 Millicurie eine schwankende Wirkung. Nach Injektion in die Tiere selbst ebenfalls keine sichere Wirkung **(62)**.

Schweres Wasser H^2_2O, hat keinen Einfluß auf die Hydrolyse von Triolein durch Pankreasl. (HUGHES **63**)).

Wasserstoffzahl: Die verschiedenen tierischen Lipasen zeigen bei Prüfung in ihrem natürlichen Milieu zunächst erstaunliche Unterschiede im optimalen ph. Wir registrieren zunächst einfach (unter Wiederholung der älteren Angaben des H. W.):

Pankreas	Mensch, Hund	7—8	RONA (Bioch. Zs. **134**).
Darmsaft (Fistel)	Rind	8,4—9,0	„ (Bioch. Zs. **64**).
	Hund	7,3	REALE (l. c. 27)
Duodenalsaft		8,5	DAVIDSOHN (B.Z. **45**, **49**)
Fettgewebe		ca. 8	QUAGLIARIELLO **64)**
Magen (Saft)	Mensch	5	DAVIDSOHN
„ „	Pawlowhund	5—7	
„ (Schleimhaut)	Schwein	7—8,6	
„ „	Hund, Kaninchen	6,3	WILLSTÄTTER (Zs. ph. Chem. **133**)
„ „	Katze, Hase	5,5	
„ „	Ratte, Pferd, *Talpa*, *Cavia*	7,1—7,9	HAUROWITZ **65)**
„	Gans, Fasan, Huhn, Seevögel	7,9—8,6	GYOTOKU **66)**
„	Hecht, Zander	7,9—8,6	
„	Flußkrebs (*Potamobius*)	5,7	KRÜGER **67)**
Leber	Rind	7,8—8,8	KNAFFL-LENZ (Arch. exp. Path. **97**)
„	Mensch	7,0	BAMANN (Zs. phys. Chem. **183**).
„	Hund	7,0—8,9	
„	Kaninchen	8,3—9,5	
Niere	Kaninchen	7,2—7,5	TANAKA **68)**
Blut		ca. 8	RONA
Blutserum	Ratte	7	TAKAHASHI **68a)**
Frauenmilch		8,5	DAVIDSOHN

58) ***T. Azuma,*** Stud. on serum lip. Jl. of Biochem. 4, 239 (1924). — 59) ***L. Pincussen, Sh. Hayashi,*** Fermente und Licht, Lipase I. Bioch. Zs. **195**, 96 (1928) S.A. — 60) ***L. Pincussen, T. Takuma,*** Einfl. des Lichtes auf die Butyrase etc. Bioch. Zs. **223**, 341 (1930) S.A. — 61) ***E. Keeser,*** Biol. Wirks. des sichtb. Lichtes etc. Arch. für exp. Path. **164**, 625 (1932) S.A. — 62) ***C. Vidal,*** Act... de radon sur le pouv. lipol. Soc. Biol. **109**, 495 (1932); BPh **66**, 639. — 63) ***A. H. Hughes c. s.,*** Some react. with heavy water. Jl. of Chem. Soc. **1934**, 1105. — 64) ***G. Quagliariello, G. Scoz,*** Lip. nel tess. adip. Arch. di Sci. biol. **17**, 513 (1932) S.A. — 65) ***F. Haurowitz, W. Petrou,*** ph-Opt. der Magenlip. versch. Tiere. Zs. phys. Chem. 144, 68 (1925). — 66) ***K. Gyotoku,*** Stud. über Lip. I, II, Biochem. Zs. **193**, 17, 27 (1928); Proc. Imp. Acad. Tokyo **3**, 242, 245; BPh **43**, 137 (1927). — 67) ***P. Krüger, E. Graetz,*** Lip. F. d. Flußkrebses. Sitzb. Ges. naturforsch. Fr. Berlin **1927**, 48; BPh **43**, 830, Zool. Jb. Allg. Zool. **45**, 463 (1928) S.A. — 68) ***T. Tanaka,*** Einfl. versch. Ionen auf Nierenlip. (Jap.) Autoref. BPh **63**, 674. — 68a) ***W. Takahashi,*** Tributyrinspalt. im Blute. Arch. ges. Phys. (Pflüger) **225**, 42 (1930).

Milchdrüse		ca. 8,8	VIRTANEN 69)
Haut		7,1—7,5	WOHLGEMUTH 70)
Bombyx mori		7,7	YAMAFUGI 71)
Helix pomatia (Darmsaft),	Reinpräp.	6,9	KUNTARA 72)
	(Jecur)	9,0	
Hirudo	Darm und Gewebe	8,8	AUTRUM u. GRAETZ 72a)

Es sind also die Lipasen des Magens der Carnivoren und des Menschen auf Wirkung im sauren Gebiet eingestellt; bei den Pflanzenfressern häufig, doch nicht immer auf alkalisch.

Zum Vergleich seien nach dem H. W. S. 472 die gemessenen Zahlen der Phytolipasen angeführt:

Ricinuslipase	5	HALEY
Chelidonium	ca. 7	BOURNOT
Takaesterase	ca. 9	OGAWA, WILLSTÄTTER
Bakterien	7	AVERY, STEVENS
B. prodigiosus, fluor. liqu.	8,8	TAMMISTO (l.c. 146)

Diese Zahlen gelten aber nur für die frischen unbehandelten Extrakte; sobald man chemisch an die Reinigung der Enzyme herangeht, ändern sich die Zahlen insofern, als alle bisher untersuchten Lipasen bei gründlicher Reinigung einem Optimum von ca. 7,5—8,0 zustreben. Die Tatsache, daß sich bei Gewebslipasen bei verschiedener Vorbehandlung verschiedene ph-Optima ausbilden, ist von K. G. FALK 73) und Mitarb. festgestellt worden. Gleichzeitig wies WILLSTÄTTER (l. c. 3, S. 17, l. c. 5, S. 8) eindringlich darauf hin, daß grade bei den Lipasen die ph-Zahlen und besonders die scheinbaren Differenzen der frischen Präparate von keiner essentiellen Bedeutung sind: „*Der Einfluß der h wird durch aktivierende und hemmende Begleitstoffe überdeckt.*" Gewisse Begleitstoffe oder Stoffe, welche die Lipase im Darm antrifft (Ca-Salze, Proteine, Gallensalze) hemmen im sauren, fördern im alkalischen Gebiet. Ebenso hemmen im Sauren die Fettsäuren, fördern im Alkalischen die Seifen. Dies gilt also für die Pankreas- und Darmlipase.

Bei den Magenlipasen mit ihrem natürlichen sauren Optimum kann es sich andrerseits um Hemmung im alkalischen Gebiet handeln; wahrscheinlich auch, wie WILLSTÄTTER und GYOTOKU annehmen, um Förderung im Sauren durch besondere Begleitstoffe.

Jedenfalls tritt bei allen Lipasen mit natürlich saurem Optimum bei der Reinigung die Verschiebung nach dem schwach alkalischen, bei der Pankreaslipase von vornherein vorhandenen Optimum bei 7,5—8,0 ein.

Eine Wiederverschiebung nach der sauren Seite durch Wieder-Hinzumischung der durch Adsorption entfernten Begleitstoffe ist GYOTOKU 66) (l. c. 86a) nicht gelungen; bei Schweinemagen tritt bei trocknen Präparaten spontan eine Verschiebung nach sauer hin auf, z.B. von 7,6 auf 7,0 bis zu 6,8 (Schwein, nicht Hund, Mensch, Kaninchen).

Umgekehrt verschiebt sich in Lösungen der Magen-Lipasen von selbst der ph nach alkalisch (von 6,8 bis 7,5). Diese Umwandlung wird durch leichte Alkalisierung der Lösung beschleunigt, durch Säure verzögert. GYOTOKU nimmt an, daß hier natürliche Begleitstoffe im Sauren aktivieren, die allmählich zerstört werden (s. o.).

Über die Kinetik in Abhängigkeit von der [H+] s. WESTENBRINK 74) 75) und H. W.

69) ***A. I. Virtanen***, Spalt. u. Synth. der Ester etc. Zs. phys. Chem. **187**, 1 (1924). — 70) ***J. Wohlgemuth, Y. Nakamura***, Verh. der Lip. in der Haut. Bioch. Zs. **175**, 216 (1926). — 71) ***K. Yamafugi***, Enz. von Bombyx mori. Bull. Agr. Chem. Soc. Jap. **10**, 57 (1934) S.A. — 72) ***W. Kuntara***, Lip. aus dem Darmsaft von Helix. Zs. phys. Chem. **225**, 169 (1934) S.A. — 72a) ***H. Autrum, E. Graetz***, Lip. Ferm. von Hirudo etc. Zs. vgl. Phys. **21**, 429 (1934) BPh **84**, 377. 73) ***H. M. Noyes, K. G. Falk c. s.***, Lipol. act. of var. tissues etc. Jl. of Biol. Chem. **55**, 653 (1923). — 74) ***H. G. K. Westenbrink, H. M. Romijn***, Influ. of [H+] in the act. of liver esterase. Arch. néerl. Phys. **15**, 529, (1930) S.A. — 75) ***Dies.***, ph-Aktiv.-Kurven der Leberesterase. Ned. Tijdschr. Gen. **1930**, I, 2182; BPh **57**, 151.

Allg. Teil § 131 ff. WESTENBRINK fand bei Mono-Aethyl-Estern zweibasischer Säuren eine Verschiebung des optimalen ph ins alkalische bei zunehmender C-Kette (Schweineleberlipase): Glutamins. 5,6, Adipins. 5,8, Pimelins. 6,0, Suberins., 6,3, Azelains. 6,9, Sebacins. 7,3. Diese Verschiebung hat nichts zu tun mit der Dissociation der Ester, die bei allen in diesem ph-Bereich vollständig ist; nur die Struktur entscheidet. Bei der Spaltung einer Reihe einfacher und Glykolester mit Diammonphosphat (nicht Borat) als Puffer durch Leberlipase fanden SOBOTKA **76)** sowie BAMANN **76a)** ein zweifaches ph-Optimum: 6,7—7,3 und 7,6—8,2; dazwischen ein Minimum. Bei Reinigung verschwindet dieses Minimum, es tritt ein flaches Maximum auf.

Schädigung durch Säuren bezw. Alkalien. Schon VOLHARD hatte angegeben, daß Magenlipase gegen Alkali empfindlicher ist als gegen Säuren, Pankreaslipase sich umgekehrt verhält. Nach GYOTOKU (l. c. 66, 86a) trifft dies für Magenlipase von Mensch und Hund zu, weniger von Kaninchen und Schwein; Pankreas- und Leberlipase sind sehr säureempfindlich. Bei Reinigung der Präparate verwischen sich diese Unterschiede, besonders wird die Magenlipase säureempfindlicher, Pankreas und Leberlipase alkaliempfindlicher. GYOTOKU arbeitete mit n/20 HCl resp. NaOH, 0,25—0,5: 1 cm^3 Lipase erzielte Hemmungen zwischen 20 und 80 %.

Bei Helixlip. nach KUNTARA (l. c. 72) steiler Abfall des ph-Opt. nach der alkalischen Seite.

§ 265^a. Neutralsalze. Im H.W. ist darüber berichtet, daß irgendwelche sicheren Gesichtspunkte über die Förderung oder Hemmung durch die üblichen Elektrolyte nicht gegeben sind. Die Wirkung scheint sehr weitgehend von den äußeren Umständen, wie Art des Substrates, ph, Begleitstoffe des Enzyms abzuhängen. So haben alle die einzelnen Angaben nur einen sehr beschränkten Wert. Mit einiger Sicherheit kann man bei vielen chemischen Stoffen sagen, daß sie unter einer gewissen Grenze aktiviren, darüber hinaus hemmen; dies gilt sogar für die „spezifischen Gifte" (§ 266a). Man kann sich mit KRAUT c.s. (l. c. 23) die Vorstellung machen, daß alle solche Stoffe erst auf die in großem Überschuß vorhandenen Begleitstoffe wirken, diese außer Gefecht setzen und so indirekt aktiviren; erst höhere Konz. wirken dann direkt auf Agon oder Pheron — Neutralsalze wohl sicher in der Hauptsache auf das Pheron —; und dann hemmen sie.

Kationen können unter besonderen Umständen starke Aktivatoren sein, wie besonders Ca als Oleat, also als Kalkseife im alkalischen Gebiet (WILLSTÄTTER, § 267); aber in reiner Wirkung soll Ca^{++} hemmen gegenüber den fördernden einwertigen Alkali-Ionen, wie im Anschluß an FALK (H.W., *l. c. 39*), CORRAN **77)** angibt, Ca^{++} und noch mehr La^{3+} hemmen auch die Synthese (RONA, AMMON, § 270).

UENO **78)** dagegen findet alle Kationen hemmend, zweiwertige mehr als einwertige: K > Na; Sr > Ca > Ba > Mg > Ni. TANAKA (l. c. 68) gibt für Nierenl. (Kaninchen) die Reihenfolge der Hemmung: Na > Li > K > Mg > (NH_4) (Sulfate) resp. K > Mg > Ca (Chloride), alles beim opt. ph. (7,2—7,5).

Auf Darmlipase bei ph = 8,6 fand dagegen Aktivirung durch Li, Na, K, Mg, Ca, (Konz. 0,1 n) REALE **79)**, Chloride > Br' > J'. Höhere Konzz. hemmen, bei 0,75 n Ca, Mg > K > Ba > Na, Li.

---

76) ***H. Sobotka, D. Glick,*** Influ. of [H+] on . . . liver lip. Jl. of biol. chem. **105**, 221 (1934); BPh **81**, 169. — 76a) ***E. Bamann, E. Rendlen,*** (Lipase). Vorl. Mitt. Zs. phys. Chem. **229**, 126 (1934). — 77) ***R. F. Corran,*** Influ. of var. subst. on lip. act. Biochem. Jl. **23**, 188 (1929). — 78) ***S. Ueno,*** Influ. of cations on . . . lip. Jl. of biophys. 2 (1927); BPh **46**, 476. — 79) ***L. Reale,*** Ester. del secr. enter. I—III. Arch. di farm. **56**, 512; Boll. Soc. Ital. Biol. **7**, 1380; **8**, 1622 (1933) S.A. Atti oc. Sci. Med. Cagliari **1933**, H. 5. S.A.

Für die Anionen ergaben die früheren Arbeiten bereits mit einiger Sicherheit, daß alle über eine gewisse Grenzkonzentration hinaus hemmen, wenn nicht fördernde Oberflächenwirkungen bei emulgirten Substraten überwiegen (TERROINE). Auch TANAKA (l. c. 68) fand alle Anionen hemmend: als K-Salze J > CNS > Cl > NO_3 > C_2O_4 > CH_3 . COO'. CLIFFORD 80) fand Cl, J bis zu 0,5, Br bis 0,25 ohne Wirkung (Pankreasl.).

Eine besondere Wirksamkeit wird der Phosphorsäure zugeschrieben, die sozusagen spezifisch aktiviren soll, sogar noch im Gebiet der ausgleichenden Aktivirung (PLATT und DAWSON 81)).

LYON 82) wollte aus den Daten dieser Aktivirung den Schluß ziehen, daß hier geradezu die Reaktionsgeschwindigkeit unmittelbar von der Konz. an PhS, und zwar $(PO_4)'''$ abhängt, nach der Formel (Aktiv. des Enzyms) × $(p\ PO_4)^n = K$; jedoch konnten die Autoren (83) in einer Nachprüfung diese strenge Beziehung nicht bestätigen. Wenn man z.B. bei ph = 7 die Gesamtmenge Phosphat konstant hält, aber durch Erhöhung des ph pPO_4 steigert, so steigt erst die Aktivität und sinkt dann wieder. Auch sonst zeigen sich Abweichungen, die mit der verschiedenen Stabilität des Enzyms bei Milieuänderungen zusammenhängen. Auch Hautlipase wird besonders stark durch Phosphat aktivirt (WOHLGEMUTH u. NAKAMURA l. c. 70).

Einig ist man sich eigentlich nur über die **Giftwirkung des Fluorions.** Besonders empfindlich sind nach LOEVENHART und RONA die Lipasen des Blutes und der Leber; bei *Helix* Hemmung bis ca. 20 % (GRAETZ 84)).

Dagegen ist die Magenlipase (auch die des Flußkrebses, l. c. 67) sehr viel resistenter; indessen muß man diese scheinbare Besonderheit darauf zurückführen, daß Magenlipase schon durch ihre natürlichen Begleitstoffe nach WILSTÄTTER sehr stark gehemmt ist. Für Darmlip. fand REALE (l. c. 79) schon unter 0,5 % nur noch schwache Hemmung. Indessen liegt auch bei den hochempfindlichen Lipasen trotz der sehr niedrigen Grenzschwelle keine absolut spezifische Giftwirkung des Fluorions vor. TERROINE zeigte (H.W., *l. c. 28a*) in ausführlichen Tabellen, daß die „Giftigkeit" des Fluorions nur eine Frage der Konzentration und des Milieus ist. In winzigen Mengen fördern die Fluorsalze genau wie es die anderen Haloide tun, so z.B. bei N/100 stärker als Br', J', Cl'. bei N/20 ebenfalls noch, aber bereits schwächer. Das Optimum liegt verschieden, einmal bei N/400, einmal bei N/60; dies hängt wieder von dem Milieu ab. Die Fluorsalze weichen also nicht qualitativ von den anderen Haloiden ab, nur quantitativ tritt die Hemmung sichtbarer hervor.

Sie ist vor allem abhängig vom ph, in saurer Lösung viel stärker als in alkalischer (ROTHSCHILD 85)). Bei 10^{-4} n. NaF betrug die Hemmung bei ph 7,59 30 %, bei 7,12 bereits 60 %, bei 6,65 69 %. Bei 10^{-3} n entspr. 12, 44, 71 %.

Die Art der Wirkung ist nicht sicher, es scheint sich nicht um eine Komplexbildung am freien Enzym, wie z. B. MURRAY 86) vermutet, sondern an der Enzym-Substrat-Verbindung zu handeln. Gegen einen Komplex am freien Enzym sprechen außer den Kurven noch die Unwirksamkeit von HCN, H_2S, Pyrophosphat etc. Die Vergiftung ist irreversibel (GYOTOKU 86a, IV), im Gegensatz zu älteren Angaben.

Arsenite hemmen nach ROTHSCHILD 85) stark und irreversibel, bei ph 7,59 zu 29% bei 10^{-4} n, im Sauren weniger.

---

80) ***W. M. Clifford,*** Eff. of hal. salts on steapt. dig. Biochem. Jl. **28,** 418 (1934). — 81) ***B. S. Platt, E. R. Dawson,*** Fact. influ. the act. of pancr. lip. Biochem. Jl. **19,** 860 (1925). — 82) ***Ch. J. Lyon,*** Phosphate ion as a promotor etc. Jl. of gen. Phys. **10,** 599 (1927). — 83) ***E. R. Dawson, B. S. Platt,*** Phosph. ion on hydrol. by pancr. lip. Jl. of gen. Phys. **11,** 357 (1928). — 84) ***E. Graetz,*** Verdau. Ferm. einheim. Pulmonaten. Zs. phys. Chem. **180,** 305. Zool. Jb. Allg. Zool. **46,** 375 (1929). — 85) ***P. Rothschild,*** Spec. Hemm. der Lip. Bioch. Zs. **206,** 186 (1929). — 86) ***D. R. Murray c. s.,*** Molec. constit. and accessab. to enz. Biochem. Jl. **23,** 292; **24,** 190 (1929/30). 86a) ***K. Gyotoku,*** Lipase III, IV. Biochem. Zs. **193,** 39; **217,** 279 (1929).

Schwermetalle wirken je nach den Bedingungen ganz verschieden. Mangansalze können fördern, was UENO (l. c. 78) bestätigt, der auch Co fördernd fand, Ni, Cu, Hg, UO_2 schwach hemmend.

CORRAN (l. c. 77) findet wieder Blei fördernd, Cu, Hg hemmend. Cu hemmt auch nach PARFENTJEW 87) (Leber, Pankreas, nicht Serum) u.U. bis herab zu 1 : 500.000. Gallensalze wirken schützend. Sehr geringe Konz. an Schwermetall (0,009 molar) fördern nach WALBUM 88), innerhalb der einzelnen Gruppen um so stärker, je kleiner die Ordnungszahl Z ist. — ROTHSCHILD fand bei 10^{-4} n gar keine Wirkung (Fe, Ni, Mn, Pb, Al) oder Hemmung (Hg, Ag, Cu). Bei 10^{-3} hemmt Fe; Mn bis 10^{-2} ohne Wirkung. Eine besondere Wirkung hat nach REMESOW 89) kolloides Nickel, es aktivirt die L. aus der unwirksamen Adsorption an Cholesterol, vielleicht durch direkte Hydrirung des Chol. — Thallium ist (Hautl.) ohne ersichtliche Wirkung (90), Uranyl-acetat hemmt erst bei hoher Konz. (91).

Oxydationsmittel zerstören das Enzym: Ozon (PALMER 92)), freie Halogene (VOLLMER 93)), auch Brom (PAUL 94)). Die Abspaltung freien Jods bedingt nach PALMER die Schädigung durch Jodoform in Aceton. Nach VOLLMER gehorcht die Giftwirkung von Jod auf Blut- und Organlipasen den Adsorptionsgesetzen. — Jodessigsäure ist ohne Einfluß (BARTH 95)).

§ 266. Organische Substanzen. Deren Wirkung ist vielfach untersucht, doch liegen hier naturgemäß sehr verwickelte Verhältnisse schon in den einfachsten Fällen vor. Die Stoffe können irgendwie auf das Enzym wirken — und zwar meist auf das Pheron —, oder aber auf das Substrat, und dann natürlich ganz anders bei saurer Reaktion als bei alkalischer. Und noch verwickelter wird die Sache, wenn sie nur auf das Reaktionssystem wirken, also die Bindung Enzym-Substrat beeinflussen. So sind die Dinge in den meisten Fällen noch unsicher, weil exakte kinetische Untersuchungen fehlen. Man kann nur provisorisch trennen einfachere „Einflüsse" von mehr oder minder ausgesprochenen sozusagen spezifischen Aktivirungen und Hemmungen.

Eine der wichtigsten und in mannigfachen Variationen untersuchte Art der Hemmung ist die durch kapillaraktive Stoffe. Wie überall, wirken diese zunächst unspezifisch durch Störung der adsorptiven Kräfte des Enzyms, indem sie das eigentliche Substrat von den aktiven Zentren der Katalysatoroberfläche wegdrängen. Jedoch gehen solche Erscheinungen ohne scharfe Grenze über in solche, bei denen der Hemmungsstoff zahlenmäßig ausdrückbare „Affinitäten" zum Enzym hat, ohne daß eine Spaltung erfolgt. Diese kann aus natürlichen Gründen ausbleiben, weil eben der Stoff garnicht spaltbar ist: so finden wir auch bei den Lipasen die überall beobachtete Hemmung durch Spaltprodukte selbst, weil diese eben noch Affinität zum Enzym haben. Oder die Spaltung bleibt aus, weil zwar an sich der Stoff spaltbar wäre, aber die Spaltungsgeschwindigkeit dieser Enzym-Substrat-Verbindung sehr gering ist. So mündet denn dieses Problem der Hemmung ohne Grenzen in das Problem der spezifischen Wirkung oder Nichtwirkung ein, weil eben bei den Lipasen die Substrate an sich — die

---

87) ***J. A. Parfentjew* c. s.,** Infl. of sod. taurochol. and coppersulf. on lipase. Jl. of biol. chem. **92**, 33 (1931). — 88) ***L. E. Walbum, K. Berthelsen,*** Bed. der Metallsalze für die Wirk. der Blutlipasen. Zs. Immun. **42**, 467. Ber. Ph. **32**, 135. — 89) ***J. Remesow* c. s.,** Blutlipase etc. Zs. exp. Med. **87**, 613 (1933). — 90) ***A. Versari,*** Az. d. tallio etc. Riv. di Pat. sper. **8**, 450 (1932); BPh **69**, 583. — 91) ***Y. Mikawa,*** Wirk. des Uranylacetats II. Biochem. Zs. **149**, 540 (1924). — 92) ***L. S. Palmer,*** Act. of ... antisept. on the activ. of lipase. Jl. Amer. Chem. Soc. **44**, 1527 (1922). — 93) ***H. Vollmer* c. s.,** Hemmung der Serumlip. und Organlip. durch Jod. Biochem. Zs. **154**, 476 (1924). — 94) ***B. Paul,*** Serum- und Organlip.-Hemm. durch Brom (Ungar.). Ber. Ph. **38**, 300 (1926). — 95) ***F. Barth,*** Wirk. von Monojodessigs. auf Diastase, Lipase etc. Biochem. Zs. **270**, 63 (1934).

Ester — schon kapillaraktive Substanzen sind und chemisch ohne scharfe Trennungsmöglichkeit in die nur hemmenden „Fermentgifte" übergehen. So liegen hier besonders die Probleme der Konfigurationsspezifität (§ 269) theoretisch auf derselben Plattform wie die der Hemmung, denn auch diese wird beherrscht von den beiden Größen: Affinität und Spaltungsgeschwindigkeit der durch die Affinität entstandenen Ferment-Substrat-Verbindung.

Diese „Affinität" müssen wir hier als gegeben voraussetzen, gleichgiltig ob es sich um wirklich spaltbare Substrate handelt oder um reine nicht spaltbare Hemmungskörper wie Alkohole. Über deren Theorie wird im Allg. Teil gehandelt. Man kann z. T. an rein chemische Hauptvalenzaffinitäten denken, wie sie LANGENBECK (l. c. 31) für seine Lipasemodelle annimmt, und wie sie MURRAY **96)** auch für Lipasen selbst diskutirt, sogar für die Überschuß-Hemmung durch die Substrate selbst (s. u.): es sollen sich Komplexe von 1 Enzym + 2 Substrat ausbilden, die schwer zerfallen. Jedoch wird man auch diese Erscheinungen mit BAMANN **97)**, **98)** und FISCHGOLD **99)** präciser deuten als Oberflächenerscheinungen auf dem Katalysator, nach den Prinzipien also der heterogenen Katalyse und den Adsorptionsgesetzen; man wird also an Stelle der rein strukturellen Verbindung die adsorptive Bindung setzen und die Hemmungen eben auch derart deuten, daß durch solche Bindungen mittelst nicht spaltbarer Stoffe oder Ausbildung nicht oder schwer zerlegbarer Substrat-Enzym-Komplexe die aktiven Zentren besetzt und unwirksam werden.

Nach diesen Vorbemerkungen seien nun nur die Tatsachen berichtet.

Unspezifische Hemmung: Die durch Chloroform ist längst beobachtet (z. B. PALMER, l. c. 92), bei Darmlip. wirkt es viermal stärker als Thymol, etwas stärker als Toluol (REALE, l. c. 79).

Chloralhydrat soll nach **100)** selektiv nur die L. der Nebennieren hemmen, nicht die aus Serum, Niere, Leber, denen sie sonst gleich ist (Atoxyl). Nach TANAKA (l. c. 68) hemmt es aber auch Nierenl. Veronal hemmt Darml. stark, als Puffer (nach MICHAELIS) nicht zu gebrauchen (REALE l. c. 79). **Urethane** wirken im Verhältnis ihrer Adsorbirbarkeit nach dem Gesetz der homologen Reihen, der Grad der Hemmung in Abhängigkeit von der Konz. folgt der Adsorptionsisotherme (RONA **101**); die Hemmung ist reversibel; besonders gilt diese Wirkung für Urethane, welche die gleiche pharmak. Wirkung wie Physostigmin (ebenfalls mit Urethanstruktur) haben, nämlich den Parasympathicus reizen. Hierzu gehören Miotin, (Urethan des Oxyphenyläthyl-dimethylamins), sowie Benzyl- und Phenylurethane; sie wirken hemmend auf Leber-, Serum- und Pankreasl. (STEDMANN **102)**), bei letzterer aber nur auf die „Esterase" **(103)**. Leberesterase (Tributyrin) wird durch das Methylurethan des m-Dimethyl-aminophenols bereits gehemmt bei 1 : 500 Millionen, dieselbe (Methylbutyrat) 1 : 13 Millionen; Lipase aus Schweinepankreas wird nur wenig gehemmt (Methylbutyrat). Da die Hemmung durch Physostigmin etc. typisch ist für die Cholin-Esterase (§ 280a), so sind diese Versuche wichtig für die Frage, ob diese ein eigenes Enzym ist oder ob die ge-

---

96) ***D. R. P. Murray,*** The inhib. of ester. by excess. substrate. Biochem. Jl. **24,** 1890 (1930). — 97) ***E. Bamann c. s.,*** Zur Kinetik der Esterhydrol. durch Enzyme. Zs. phys. Chem. **183,** 149 (1929). — 98) ***E. Bamann c. s.,*** Einfl. von Spaltprod. auf das opt. Auswählen einer Esterase. Ber. Chem. Ges. **64,** 897 (1931). — 99) ***H. Fischgold, R. Ammon,*** Gesetzmäßigkeit der Fermentsubstratbindung. Biochem. Zs. **247,** 338 (1932). — 100) ***M. Tscheboksarow, S. J. Malkin,*** Nebennierenlip. Klin. Ws. **1927,** 1472. — 101) ***P. Rona, A. Lasnitzki,*** Über die Wirk. der Urethane auf Serumlip. Biochem. Zs. **163,** 197 (1925). — 102) ***E. Stedman c. s.,*** The inhib. action of certain synth. urethanes on the activity of liver esterase. Biochem. Jl. **25,** 1147 (1931) **26,** 1214 (1932) S.A. — 103) ***E. Stedmann c. s.,*** Inhib. of esterases by miotin etc. Intern. Phys. Kongr. Roma 1932. BPh **72,** 723.

wöhnliche Serumlip. auch Acetylcholin zerlegt. Die relativen Wirkungen isomerer Urethane verschieben sich etwas bei Serum- und Leberlip. desselben Tieres.

Besonderes Interesse hat die Hemmung durch allerlei Stoffe mit Hydroxylgruppen resp. Carbonylgruppen, weil sie eben zu den spezifischen Hemmungen durch zahlenmäßige Affinitäten überleitet. Die Hemmung durch einfache Alkohole ist zuerst von WILLSTÄTTER (l. c. 6) gemessen worden, weiterhin von FUJIHARA 104) und besonders eingehend von MURRAY (l. c. 96), 105). Auch Ketone hemmen und zwar um so stärker, je länger die Kette ist.

MURRAY hat nach verschiedenen Grundsätzen versucht, hier fixirbare Zahlenwerte zu geben. So schätzt er z.B. die „relative Affinität". Setzt man die des Methylbutyrats = 1, so erhält man für Acetophenon 4,35, Benzophenon 2,5, Benzaldehyd 2,75, Phenylmethylcarbinol 2,75, Anisol und Phenol 1,25, Cyclohexanol 0,6. Ein anderer Vergleichswert ist der „Hemmungswert" (*„inhibition number"*) (Schafleber-Esterase, Aethylbutyrat). Er drückt aus das Verhältnis der Anzahl von Molen Methylalkohol, die eine 25 %-ige Hemmung bewirken, zur Anzahl von Molen der zu untersuchenden Substanz, die unter den gleichen Arbeitsbedingungen die gleiche Hemmung bewirken. Methylalkohol = 1, Aethylalkohol = 3,1, Propylalkohol = 8,2, Hexylalkohol = 89,0, Oktylalkohol = 459,0, Nonylalkohol = 838. Hiernach wächst also die hemmende Wirkung sehr rasch mit der Verlängerung der Kohlenstoffkette, also wie immer bei solchen kapillaraktiven Stoffen mit der Unlöslichkeit in Wasser. Dasselbe gilt auch für L. aus Karpfenleber (KERNOT 107)). Aus den Hemmungswerten der isomeren Amylalkohole kann man den Schluß ziehen, daß in dem Maße, in dem die sterische Hinderung der OH-Gruppe wächst, die hemmende Wirkung bezw. die Tendenz des Hemmungskörpers, mit dem Enzym sich zu verbinden, abnimmt (GLICK und KING 106)). Der Hemmungswert einiger sekundärer Alkohole deutet darauf hin, daß hier der Einfluß der sterischen Hinderung, welche die hemmende Wirkung herabsetzt, übertönt wird von der Verlängerung der Kohlenstoffkette (vgl. oben die gleiche Auswirkung der Kettenlänge bei den Ketonen). GLICK und KING geben weiterhin an, daß bei einer Reihe von Amyl- und Phenylverbindungen mit CN, J, NO_2, SH, Br, OH, Cl, CO, $CONH_2$, NH_2 die hemmende Wirkung ebenso verläuft, wie die Wirkung der freien Ionen dieser Gruppen bei der lyotropen Reihe — BAMANN (l. c. 188) bringt dies mit der basischen Natur der L. zusammen. Die bei weitem stärkste Hemmung aller untersuchten Stoffe hat Hexyl-Resorcin. Im Hinblick auf die theoretisch so ähnlichen Probleme der Konfigurations-Spezifität ist es besonders interessant, daß bei L. der Schafleber (Kaninchen nicht) die (—)-Formen von Carbinolen fünfmal so stark hemmend wirken als (+) (MURRAY und KING 105)), und zwar bei Methyl-n-hexyl-carbinol, Methylphenylcarbinol, Methyl-β-Phenylaethylcarbinol.

Sehr sonderbar sind spätere Mitteilungen von GLICK und KING 108), daß dieselben Alkohole, deren Hemmung der Leberl. sie beschrieben haben, die Pankreaslip. aktiviren, und zwar parallel ihrer Oberflächen-aktivität (Resorcin, Phenol, Alkohole C_5, C_6, C_8, Cyclohexanol). Eine Erklärung dafür wird man wohl wieder in den ganz verschiedenen Agon-Pheron-Relationen beider Enzymtypen zu suchen haben.

Diese Hemmung durch kapillaraktive Alkohole schlägt unter Umständen ins Gegenteil um, wenn man die wasserlöslichen höheren Alkohole untersucht. Glycerol ist nach WILLSTÄTTER (l. c. 6) stark fördernd, bis zu 30 %iger Lösung, und zwar wirkt es sowohl bei Methylbutyrat, wie bei Olivenöl in schwach alkalischen Milieu

---

104) ***M. Fujihara,*** Einfl. des Alkol. etc. auf Steapsin Okay. Jkak. Z. 428, 887 (1925) (jap.); BPh 34, 726. — 105) ***D. R. P. Murray, C. G. King,*** The affin. of liver ester. for optic. act. alcohols. Biochem. Jl. 24, 190 (1930). — 106) ***D. Glick, C. G. King,*** Rel. betw. the structure of . . . alcohols and their inhib. eff. upon . . . esterase. Jl. of Biol. Chem, 94, 497 (1931); 95, 477 (1932). — 107) ***J. C. Kernot, H. W. Hills,*** Hemmungseff. primärer Alkoh. auf Lip. Zs. phys. Chem. 222, 11 (1933) S.A. — 108) ***D. Glick, C.G.King,*** Rel. betw. the activ. of lip. etc. Jl. of biol. chem. 97, 675 (1932).

(ph = 8,9) bis zu 82 % aktivirend. Auch Zucker sollen nach FRISCO 109) fördern; er denkt an eine Komplexbindung mit hemmenden Metallkationen, ebenso bei Oxysäuren (s.u.).

Außer den Alkoholen wirken noch andere O-haltige Stoffe hemmend, indem sie das Enzym binden, so Laktone (BAMANN 110)); jedoch leitet dies direkt zum Problem der Substratspezifität über, da die Laktone als „innere Ester" aufgefaßt werden können, wir werden dies also § 268 berichten.

Dagegen sei hier noch der Einfluß chinoider Indikatoren erwähnt, der praktisch wichtig ist. BAMANN 111) führt ihn, besonders bei den Phtaleinen, mit Recht auf die bei wechselndem ph erfolgenden Übergänge von der benzoiden Struktur des Phtalophenon zum chinoiden Salz zurück, so daß diese Indikatoren je nach dem ph bald hemmen, bald aktiviren. Es bilden sich je nach dem Zustande des Indikators verschiedene Arten von Zwischenverbindungen zwischen dem Enzym und dem Farbstoff aus.

Besonders wichtig aber ist, daß nun auch normale Ester die Wirkung hemmen können, wodurch die Erscheinungen noch näher an die spezifischen Wirkungen als solche heranrücken. Dies zeigt sich schon bei Hydrolysen ohne jeden fremden Zusatz, so daß bei großem Überschuß an Substrat die p_s-Aktivitätskurve sinkt. (MURRAY, BAMANN, FISCHGOLD). Auch zugesetzte einfache Ester können hemmen (Triacetin, WILLSTÄTTER). Da diese Hemmungen zur Prüfung der Fermenttheorien (Wirkung des freien Enzyms im Sinne NORTHROPS oder der Enzym-Substrat-Verbindung im Sinne von MICHAELIS) wichtig sind, hat WESTENBRINK 112) die Kinetik an Beispielen solcher Gemische einfacher Ester geprüft.

Er untersuchte ein Gemisch von Monoaethylestern der Sebacinsäure und Azelainsäure. Bei den einzelnen wie beim Gemisch ist die optimale Substratkonz. bei 2 %, die Reaktionsgeschwindigkeit liegt in der Mitte zwischen den RG. der einzelnen Ester. Diese Resultate bekräftigen die Annahme einer spezifischen Affinität zwischen Enzym und Substrat, so daß das Enzym zwischen den beiden Substraten verteilt wird, und somit indirekt die Auffassung, daß auch diese einfachen Hemmungen auf wahrhafte Affinitäten zu beziehen sind.

Ein besonders markanter Fall dieser Art, Hemmung durch ausgesprochene Affinität zum Enzym ohne Spaltung, ist die vollständige Verhinderung der Wirkung durch einige Ester von Ketocarbonsäuren, die WILLSTÄTTER 113) fand. Es zeigte sich, daß als Substrat benutzte Mandelsäureester den Ester der Phenylglyoxylsäure enthielten, wodurch die Reaktion stark verzögert wurde. Die überaus hohe Affinität der Esterase zu gewissen Ketonsäure-Estern hat BAMANN 114) direkt gemessen (vgl. § 268).

Sonstige organische Stoffe: Die Salze der einfachen niederen Fettsäuren haben keinen Einfluß, die der Oxysäuren (Laktate, Citrate, Tartrate, auch Oxalate) sind verschieden wirksam befunden worden: schwach fördernd nach FRISCO (l. c. 109), gleichgiltig nach ROTHSCHILD (l. c. 85), Laktate schwach hemmend nach MURRAY, viel stärker die Salze der Brenztraubensäure.

Dagegen sind die eigentlichen Fettsäuren starke Hemmer, aber nach WILL-

---

109) ***A. Frisco,*** Az. di sostanze conten. ossidrilli alcoolici sulla lipasi pancr. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **3**, 299 (1928); BPh **47**, 488. — 110) ***E. Bamann, M. Schmeller,*** Verh. der Esterasen gegenüber Laktonen. Zs. phys. Chem. **194**, 14 (1931). — 111) ***Dies.,*** Einfl. der Indikatorfarbst. auf das Wirkungsvermögen der Esterase. Ebenda **194**, 1 (1931). — 112) ***H. G. K. Westenbrink,*** On the mech. of enz. react. II. Arch. néerl. Phys. **15**, 538 (1930) S.A. — 113) ***R. Willstätter c. s.,*** Hemm. der Leberesterase etc. Zs. phys. Chem. **167**, 303 (1927). — 114) ***E. Bamann, M. Schmeller,*** Reakt. Verlauf d. Spalt. von Gemischen aus Mandels.-Ester etc. Zs. phys. Chem. **188**, 251 (1930).

STÄTTER nur im sauren Gebiet, während sie im alkalischen Gebiet, als Seifen, auf die meisten L. spezifisch aktivirend wirken, worauf erst § 267 einzugehen sein wird.

Harnstoff ist ohne Einfluß (SMORODINZEW **115)**).

Carotinoide, dh. Vitamin A enthaltende Substanzen sollen fördernd wirken (JOHNSON **116)**).

Lecithin und Cholesterol sind in vitro ohne Einfluß (FUJIHARA **117)**) oder schwach fördernd (CORRAN l. c. 77). Nach JEDLIČKA **118)** wird Pankreasl. gehemmt, Seruml. nicht. Von der starken Hemmung durch physiologisch verteilte Lipoide z.B. im Schwangerenblut oder nach künstlicher Zufuhr infolge spezifischer Adsorption ist hier natürlich abzusehen (§ 279); diese Adsorbate bilden nach REMESOW (l. c. 89) bei der Präparation geradezu „künstliche Zymogene" (§ 267).

Hormone: Von allen Hormonen zeigen nach MÜHLBOCK und KAUFMANN **119)** nur Kallikrein und Thyroxin (bei $1:10^7$) deutliche Hemmung. Serumlipase ist von Thyroxin nur schwach zu beeinflussen (bestätigt von BACH **120)**, während Kallikrein auch diese stark hemmt. Gegen Thyroxin verhalten sich L. aus Fettgewebe, Placenta, Pankreas, Leber gleich. Präphyson, Insulin und Follikelhormon zeigen eine schwache Hemmung, doch beruht diese beim Follikelhormon nicht auf der reinen Substanz, sondern auf Begleitstoffen **(121)**; hier liegt vielleicht eine hemmende Adsorption durch die sterinähnlichen Substanzen vor. — Dagegen hat Thyroxin eine echte Affinität zum Enzym, wie aus dem Hemmungskoefficienten hervorgeht. — Insulin hemmt L. aus Fettgewebe bei 10^{-5} **(119)**, ist aber auf Serumlipase nach **122)** ohne Einfluß.

§ 266a. Vergiftung mit Atoxyl und Alkaloiden. Die von RONA entdeckten eigenartigen Differenzen der verschiedenen Lipasen gegenüber Atoxyl einerseits, Chinin und anderen Alkaloiden andrerseits (vgl. a. § 275) haben auch weiterhin großes Interesse erweckt. Allgemein sei vorausgeschickt, daß es sich auch hier um eine den Adsorptionsgesetzen folgende Giftwirkung handelt (RONA und AMMON **123)**). Über die Abhängigkeit vom ph s. SMORODINZEW **115)**. Danach hemmt nur die freie Base (ph = 8), während unter 6,8 eine Förderung eintritt. (Pankreaslipase, Triacetin, Chinin). Sehr kleine Mengen können auch hier fördernd wirken, s. d. allgemeine Bemerkung § 265a.

RONA hat zunächst nur mit der Differenzirung zwischen Chinin und Atoxyl gearbeitet, später wurden auch andere Alkaloide wie Cocain und Strychnin untersucht, sowie noch viele andere, auch isomere Stoffe (RONA und AMMON). Die Alkaloide der Tropanreihe haben eine geringfügige Wirkung, l-Ekgonin garkeine (RONA und AMMON). Optische Isomere wirken meist verschieden stark, was mit der Konfigurations-Spezifität (§ 269) zusammenhängt, so l-Adrenalin > d, l-Chinin > d-Chinidin.

Eine von INTROZZI **124)** aufgestellte, von mir ergänzte Tabelle mag eine erste

---

115) ***J. Smorodinzew c.s.***, Chinin- und Harnstoffwirk. auf Pankr. Lip. etc. Bioch. Zs. **181**, 149 (1927). — 116) ***B. L. Johnson***, Accel. of lip. activ. by ... vitamin A. Iowa State Coll. Jl. Sci. **2**, 145 (1928). — 117) ***M. Fujihara***, Einfl. des Alkoh. und Lecith. auf Steapsin (jap.). BPh **84**, 726. — 118) ***Vl. Jedlička***, Blutlipase. Zs. exp. Med. **47**, 534 (1925). — 119) ***O. Mühlbock, C. Kaufmann***, Die Wirkung des Thyroxins auf die fettspalt. Fermente. Bioch. Zs. **238**, 377 (1931). — 120) ***E. Bach c. s.***, Wirk. d. Thyroxins auf Serumlip. Arch. für exp. Path. **165**, 614 (1932). — 121) ***O. Mühlbock, C. Kaufmann***, Wirk. des brunstauslös. Horm. auf Lipasen. Arch. für Gynäkol. **149**, 623 (1931). S.A. — 122) ***H. Tsudzimura***, Blutlipase und Insulin. Arch. ges. Phys. (Pflüger) **237**, 249 (1934) S.A. — 123) ***P. Rona, R. Ammon***, Zur stereochem. Spezif. der Lip. u. Beitr. zur Giftwirk. an den fettspalt. Fermenten. Biochem. Zs. **181**, 49 (1927). — 124) ***P. Introzzi***, Lip. resist. all'arsen. nel siero etc. Boll. Soc. Med. Pavia **1928**, 853; Ber. Ph. **48**, 816.

Übersicht über das Verhalten der einzelnen Lipasen geben (+ = Giftwirkung, — = resistent).

(Literatur s.a.b. den einzelnen Lipasen, § 271 ff)

Organ	Atoxyl	Chinin	Cocain	Strychnin	Autor
Serum	+	+	+	+	
Erythrocyten	—	—	—	—	Simon 125)
Leber	+	—	—	—	
Niere	+	—	—	—	
Nebenniere	+	—	—	—	(l. c. 100)
Thyreoidea	—	—			Herzfeld 126)
Pankreas	—	+		+	
Darm (Hund)	—	—			Reale (l. c. 79)
Lunge	+	—			
Magen	—	+	—	+	
Haut	+	+			
Speichel		—			
Frauenmilch	—	—			Gottstein 127)
Hoden, Ovar	—	—			}
Thymus	—	—			} Herzfeld 128)
Hypophyse	—	—			}

Jedoch ist diese Tabelle bei Weitem nicht ausreichend. Ganz abgesehen von differenten Angaben hat sich herausgestellt, daß auch die Tierart beim gleichen Organ berücksichtigt werden muß, da diese L. sich häufig ganz verschieden verhalten. Schon aus den älteren Angaben ging hervor, daß im Gegensatz zur menschlichen die Pankreasl. des Schweines atoxylempfindlich ist, — die Magenl. des Schweines ist chininfest.

Ungemein differente Angaben liegen für die Serumlipase vor, wahrscheinlich weil eben Seruml. kein einheitlicher Begriff ist (§ 279). Atoxyl: Nur für dieses Gift findet man eine Parallele mit der allgemeinen Giftempfindlichkeit; es soll nur bei Carnivoren und beim Kaninchen stark hemmen, bei anderen Pflanzenfressern kaum (Kudrjawzewa **129**)). Dagegen nach Oyama **130**) bei Hund garnicht, Kaninchen schwach, ebenso Kröte. Atoxylresistenz beim Hund auch D'Ignazio **131**).

Chinin absteigend (ältere Angaben) Mensch, Hund, (bestätigt von Oyama **130**)) Pferd, Kaninchen, Katze, Ratte, *Cavia*, Maus, in der Mitte liegend Hammel, Rind (**129**); Kröte etwa wie Kaninchen. Daneben fand aber di Macco **133**) im Hundeserum anteilig eine chininfeste, sehr thermolabile L. — Chinininjektion (Hund) hat auf die Seruml. keinen Einfluß (Avellone **134**).

Weiterhin ist zu der Tabelle noch zu ergänzen:

Während nach Herzfeld **128**) Nebennierenl. sowohl gegen Atoxyl wie gegen Chinin resistent ist, findet Tschéboksarow (l. c. 100) Atoxyl hemmend. Darmsaft (Hund) ist nach Reale (l. c. 79) hochresistent gegen beide. Lipase des Fettgewebes ist nach Quagliariello (l. c. 64) empfindlich gegen Atoxyl; Chinin nur in kleinen Dosen, während größere (0,25 °/₀₀) aktiviren. Gallensaure Salze aktiviren wie bei Pankreaslipase.

Placentalip. sollte nach Clauser **135**) chinin- und atoxylfest sein, doch wird dies

125) ***H. Simon,*** Über rote Blutkörp.- u. Serumlip. Zs. exp. Med. **39**, 407 (1924). — 126) ***E. Herzfeld, W. Engel,*** Über chinin- und atoxylfeste Lip. in der Thyreoidea. Biochem. Zs. **151**, 310 (1924). — 127) ***W. Gottstein,*** Frauenmilchlip. Jb. Kindh. **106**, 97 (1924). — 128) ***E. Herzfeld, W. Engel,*** Über chinin- und atoxylfeste Lip. innersekret. Org. Biochem. Zs. **160**, 172 (1925). — 129) ***A. Kudrjawzewa,*** Einfl. einiger Gifte auf die Serumlip. Fermentforsch. **9**, 139 (1927). — 130) ***J. Oyama, S. Hiwatari,*** Arteigent. ein. Ferm. Verh. Jap. Ges. inn. Med. **1926**, 97; BPh **42**, 733. — 131) ***C. d'Ignazio,*** Lip. del siero nel cane. Fisiol. e Med. **3**, 432 (1932); BPh **70**, 321. — 133) ***G. di Macco,*** Az. del calore s. sierolip. Riv. di Pat. sper. **1**, 448 (1926); BPh **41**, 123. — 134) ***L. Avellone, G. Damiani,*** Az. d. chinino sul pot. lipol. Riv. di Pat. sper. **1**, 193 (1926); BPh **37**, 464. — 135) ***F. Clauser,*** Esterasi placent. Riv. ital. Ginec. **4**, 115 (1926); BPh **36**, 321.

mehrfach bestritten, was Atoxyl anlangt. Nach ABE 136) ist sie fast resistent gegen Chinin und Strychnin, nicht aber gegen Atoxyl und Cocain.

Andere Gifte. Die angeblich einzig dastehende Hemmung durch Chloralhydrat bei Nebennierenlip. ist bereits erwähnt, gegen Strychnin und Cocain ist sie resistent (l. c. 100). Cocain und Strychnin weiterhin: Placentalip. s. o.; Seruml. +, Niere, Erythrocyten. (BROCKMEYER 137)). Cocain Magenlipase Kaninchen +, andere —, Blut und Lymphe + nur bei alkal. Reaktion (TERASHIMA 138)). Strychnin + nur Leber (Kaninchen, Schwein), Magen (Kaninchen), Pankreas (Rind) (GYOTOKU 139) IV). Strychnin beschleunigt bei Leberlipase die Spaltung von d (—)-Mandelaten (§ 269).

Morphin hemmt Serumlipase nur bei Hund nennenswert (129); Pankreasl. durch Morphin gehemmt (KEESER 140)).

Eine Reihe von Stoffen auf Nierenlipase (Kaninchen) hat TANAKA 141) untersucht. Stark hemmend (absteigend) Atoxyl, Physostigmin, Remijin, Chloralhydrat, Simomenin, Novasurol, Coffein. natriobenzoicum, Na-Salicylat. Nicht hemmend u. a. Strychnin, Cocain, Pilocarpin, Morphin, Atropin, Ephedrin. — Serumlipase nach PENNETTI 142) resistent u.a. gegen Atropin, Antipyrin; gehemmt durch Morphin, Coffein, Pilocarpin, Heroin, Dionin, Apomorphin. Na-Salicylat und Acetylsalicylsäure sollen etwas steigern. Salvarsan, Kakodyl ohne Einfluß, Methylenblau, Acridinfarbstoffe hemmen (142a).

Die Magenlip. des Flußkrebses *Potamobius astacus* hat KRÜGER 143) untersucht. Chinin hemmt, wirkungslos sind Coffein, Strychnin, Hyosyamin und NaF. — Darmsaftlip. von *Helix*: NaF, Chinin hemmen, Atoxyl nicht (KUNTARA, l. c. 72), ebensowenig Strychnin (GRAETZ 144)). Giftwirkungen bei *Hirudo* s. § 278.

Taka-Esterase ist gegen alle diese spezifischen Gifte, auch NaF fast gänzlich resistent (OGAWA 145)) dagegen Bakterienlipase atoxylfest, chininempfindlich (TAMMISTO 146)).

Es ergab sich nun die Frage, ob diese Wirkungen enzymspezifisch sind oder von den Begleitstoffen abhängig; das erstere hätte eine völlige Verschiedenheit des Fermentsystems selbst, eigentlich sogar der Wirkungsgruppe, besagt, was nach den allgemeinen Ergebnissen WILLSTÄTTERS unwahrscheinlich war. Wir müssen uns nur immer wieder darüber klar sein, was unter „Begleitstoffen" zu verstehen ist. Es gibt immer drei Kreise: den eigentlichen Symplex (Agon + Pheron), die noch zum System gehörigen notwendigen Begleitstoffe, die nach KRAUT (l. c. 23) in der Hauptsache noch aus Pheron selbst im Überschuß bestehen; und die accessorischen Begleitstoffe des „Milieus", die durch die normalen Reinigungsprozesse zu entfernen sind.

RONA 147) war zunächst der Meinung, daß hier wahrhaft enzymspezifische Wir-

136) ***M. Abe,*** Plac. ferm. I, Lipase. Jap. Jl. obstetr. **13**, 301; BPh **59**, 318. — 137) ***J. Brockmeyer,*** Wirk. d. Cocains u. Strychn. auf Organlip. Klin. Ws. **8**, 1526 (1924). — 138) ***S. Terashima,*** Tributyrinase der Lymphe. Mitt. Med. Ges. Tokyo **44**, 139 (1930); BPh **55**, 803, — 139) ***K. Gyotoku c. s.,*** Lipase III, IV. Biochem. Zs. **198**, 39; **217**, 279 (1929). — 140) ***E. Keeser,*** Morphin und Ferm. Arch. exp. Path. **167**, 267 (1932) S.A. — 141) ***T. Tanaka,*** Einfl. versch. Arzneimittel auf Nierenlip. (jap.); BPh **63**, 517 (1931). — 142) ***G. Pennetti,*** Az. di alc. medicam. s. sierolip. Riv. di Pat. **2**, 93 (1927); BPh **42**, 150. — 142a) ***A. Nadel,*** Hautkrankh. und Serumlip. Arch. für Derm. **170**, 397 (1934) BPh 84, 465. — 143) ***P. Krüger, E. Graetz,*** Lip. F. des Flußkrebses. Sitzber. Ges. naturf. Freunde, Berlin **1927**, 48; BPh **43**, 830. Zool. Jb. Allg. Zool. **45**, 463 (1928) S.A. — 144) ***E. Graetz,*** Verd. Ferm. einheim. Pulmonaten. Zs. phys. Chem. **180**, 305; Zool. Jl. Allg. Zool. **46**, 375 (1929). — 145) ***J. Ogawa,*** Fettspalt. F. der Takadiast. Bioch. Zs. **149**, 216 (1924). — 146) ***E. S. Tammisto,*** Lip. der Bakt. Ann. Acad. Sci. Fenn. A **38**, 1 (1933) BPh **84**, 310. — 147) ***P. Rona, H. Petow,*** Giftempfindlichk. von Lip. versch. Herkunft. Bioch. Zs. **146**, 144 (1924).

kungen vorliegen, um so mehr als es nicht möglich ist, empfindliche Enzyme durch Mischung mit dem resistenten System selbst resistent zu machen; man kann auch in Mischungen beide Enzymgruppen durch die „Giftanalyse" unverändert nachweisen. Es ist aber doch wohl sicher WILLSTÄTTER im Recht, wenn er (l.c. 8) die Wirkung in der Haupsache auf die accessorischen Begleitstoffe, also das Milieu bezieht. Diese anscheinend spezifischen Wirkungen sind also nicht anders zu deuten, wie es allgemein § 265 vorausgeschickt worden ist.

Dafür sprach schon die von RONA selbst gefundene Tatsache, daß etwas gereinigte menschliche Pankreaslipase weniger empfindlich gegen Chinin wird, und die späteren Befunde von ZUMMO 148) und GYOTOKU (l. c. 139), daß es auch von Natur weniger empfindliche bis völlig resistente Pankreaslipasen und hemmbare Leberlipasen gibt. WILLSTÄTTER konnte weiter zeigen, daß Pankreaslipase vom Schwein durch Albumin hoch chininempfindlich gemacht werden kann; und WOHLGEMUTH 149), daß die an sich nicht empfindliche Hautlipase durch Dialyse gegen Chinin und Atoxyl empfindlich werden kann. Ferner fand RONA mit GYOTOKU 150) 151) selbst, daß man die resistente Magenl. des Schweines durch gründliche Reinigung chininempfindlich machen kann; umgekehrt wird Leberl. von Kaninchen fast resistent gegen Atoxyl. Leberlipase wird durch Reinigung empfindlicher gegen Coffein (22 %) und Pilocarpin (25 %) (RONA u. AMMON l. c. 122).

RONA erkennt danach die Wichtigkeit der Begleitstoffe an, wenn er auch glaubt, daß sie sehr fest mit dem eigentlichen System Enzym verankert sein müssen; jedoch ist es nicht wahrscheinlich, daß die Gifte tatsächlich auf den Symplex selbst wirken, vielleicht aber noch auch auf das engere System. Jedenfalls richtet sich die Hauptwirkung auf das Milieu im weiteren Sinne, die accessorischen Begleitstoffe. Die Annahme ist durch die Versuche von GYOTOKU 151) (l. c. 139) weitgehend gestützt worden. Betr. Chinin fand er, daß alle frisch refraktären L. durch weitgehende Reinigung empfindlich werden; umgekehrt wirkt Trocknung der Rohpräparate; bei diesen kann Chinin dann geradezu aktivirend wirken; KRAUT (l. c. 23) deutet diese Aktivirungen so, daß durch die „Giftwirkung" zuerst überschüssige und hemmende Massen von Begleitstoffen unwirksam gemacht werden, vgl. § 265a.

Gegen Atoxyl sind Magenlipasen im allgemeinen wenig empfindlich; dagegen ist die von *Cavia* hochempfindlich, und bei Schweinemagen finden sich gelegentlich hochempfindliche Lipasen. In beiden Fällen zeigen Reinpräparate keine oder minimale Empfindlichkeit; dasselbe gilt aber von der an sich gegen Atoxyl so überaus empfindlichen Leberlipase. Auf die Bedeutung der Begleitstoffe deuten die Versuche von AMAKI 152), daß in rohen Pankreas-auszügen die Gifte anders auf die „lipatische" als auf die „esteratische" Funktion wirken. Atoxyl soll die Lipase fördern, ebenso Cocain und in kleinen Konzentrationen auch Chinin.

Auch die zahlreichen Beobachtungen über die Beeinflussung der Konfigurationsspezifität der Lipasen besonders durch BAMANN c.s. (§ 269a) sprechen dafür, daß nicht Lipasen verschiedener Natur vorliegen, sondern nur verschiedene Systeme, bedingt durch mehr zufällige, accessorische und eventuell abtrennbare Beimischungen. Über das Auftreten fremdartiger Lipasen im Serum s. § 275.

---

148) ***C. Zummo***, Infl. dei sali di chinina s. lip. pancr. Boll. Soc. Ital. Biol. **3**, 455 (1928); BPh 48, 553. — 149) ***J. Wohlgemuth***, ***Y. Nakamura***, F. der Haut VI. Bioch. Zs. **175**, 216 (1926). — 150) ***P. Rona***, ***K. Gyotoku***, Lipasevergift. durch Chinin u. Atoxyl. Bioch. Zs. **167**, 171 (1926). — 151) ***K. Gyotoku***, Organlip. u. Chinin-Wirk. Proc. Imp. Acad. Tokyo **3**, 368 (1927). — 152) ***J. Amaki***, Zur Identitätsfrage der Lipase und Esterase. Tohoku Jl. of exp. Med. **8**, 146 (1926); BPh **40**, 285.

§ 267. Aktivatoren und Hemmungskörper. Die außerordentlich komplizierten Verhältnisse, die dadurch zustandekommen, daß die Lipasen in ihren natürlichen Milieus weitgehend von hemmenden oder fördernden Begleitstoffen abhängig sind, konnten erst im Prinzip von WILLSTÄTTER dadurch geklärt werden, daß es ihm möglich war, Rohextrakte mit weitgehend gereinigten Präparaten zu vergleichen. Er zeigte, daß Aktivatoren vor allem im alkalischen Gebiet wichtig sind, die im Sauren garnicht wirken oder sogar hemmen. Andrerseits können natürliche Hemmungskörper für das alkalische Gebiet vorhanden sein, so bei der Magenlipase.

So kam WILLSTÄTTER zu dem auch praktisch so ungemein wichtigen Begriff der „ausgleichenden Aktivirung". Wenn man die verschiedenen Enzympräparate maximal aktivirt, so hat man eine Möglichkeit, sie zu vergleichen (§ 264). Als bevorzugtes Mittel zur Aktivirung benutzt er Albumin + Ca-Oleat, die durch gekoppelte Adsorption wirken (H. W. S. 477).

Es weist indessen KRAUT (l. c. 23) darauf hin, daß man die Verhältnisse teilweise etwas anders zu deuten hat. Die Kalksalze, speziell das Oleat, wirken als wahrhafte Aktivatoren durch die Bildung komplexer Adsorbate. Die zugesetzten Proteine aber können auch ganz anders wirken, nämlich als Ersatz für mangelndes Pheron. Bei solchen Enzympräparaten, die relativ reich an Agon sind (z. B. Pankreaslipase) kann man durch Zusatz eines genuinen Proteins eine zusätzliche Vereinigung dieses Überschusses an Agon mit dem Protein als „Pheron-Ersatz" zu neuem Symplex herbeiführen. Es handelt sich dann also nicht um eine Aktivirung, sondern um eine Neubildung von Ferment. Ob dabei nur das Protein an sich oder ein darin enthaltener besonderer Trägerstoff wirksam ist, muß vorläufig offenbleiben, ist aber für das Prinzip ganz gleichgiltig. Dagegen läßt sich Leberlipase, die an sich überreich an Pheron ist, durch Albumin überhaupt nicht in der Wirkung verstärken, — durch andere wahrhafte Aktivatoren freilich auch nicht (s. u.). Ebenso verhält sich Darmlipase (REALE, l. c. 79), die in der Hauptsache eine Desmolipase, an Zelltrümmer gebunden ist.

Sehen wir also von dieser etwas anders zu deutenden verstärkenden Wirkung von Proteinen ab, so gehören zu den wichtigsten Aktivatoren im engeren Sinne die im alkalischen Gebiet wirksamen Seifen, besonders bei Gegenwart des ebenfalls aktivirenden Calciums, also als Ca-Oleat (l. c. 8).

Aber auch diese versagen bei Leberlipase; diese kann sogar gehemmt werden; ebenso versagen die Gallensalze; alle folgenden Angaben beziehen sich also nur auf die L. anderer Herkunft, vor allem auf die des Pankreas. Ebenso wie die Leberl. verhält sich nach REALE (l. c. 79) die des Hundedarms, bei der Seifen hemmen. Diese Sonderstellung der Leberl., die sich auch bei weitgehender Reinigung nicht ändert, ist trotz unserer vertieften Auffassung der Sachlage noch nicht einfach zu deuten. Sie hängt aber jedenfalls damit zusammen, daß Leberl. tatsächlich ein besonderes, aus der Leber stammendes Pheron besitzt (l. c. 23), also ein abweichendes System darstellt, das sich demnach auch gegen die eigentlichen aktivirenden Stoffe anders verhalten kann. Das ist aber natürlich noch keine genügende Erklärung. Daß Leberl. einen natürlichen Aktivator enthält (s. u.), der schwer abzutrennen ist, ist nun ebenfalls anders zu deuten: es ist dies kein „Aktivator", sondern Anteil des Pheron, diese „Abtrennung" ist also eine Schwächung des Enzyms durch Beeinträchtigung des Gleichgewichtes, Freisetzung von Agon und Umwandlung in Anagon.

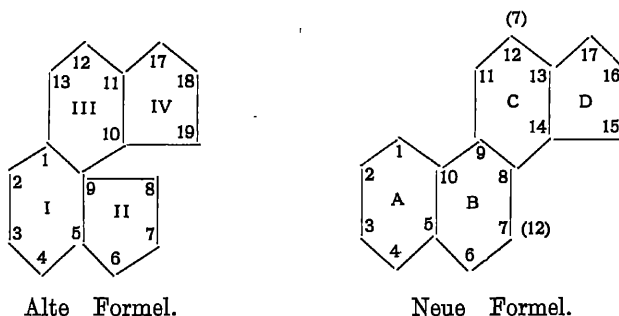
Wir können also zunächst nur die Tatsache hinnehmen, daß Leberlipase (abgesehen von diesem gewaltsamen Eingriff) durch ihre natürlichen Begleitstoffe nicht wesentlich

in ihrer Aktivität beeinflußt ist, und daß sie durch alle Reinigungsprozesse hindurch stets an sich maximal aktivirt ist. Man kann sie also — wie die Saccharase — durch alle Stadien der Reinigung hindurch quantitativ verfolgen, wie dies neuerdings wieder BAMANN (l. c. 22) einwandsfrei gezeigt hat; zum mindesten gilt dies für die Spaltung von Butyraten, bei Tributyrin sind schon von WILLSTÄTTER c.s. Verschiebungen nach unten beobachtet worden (l. c. 8, 14). Ähnlich scheint es bei der L. der Frauenmilch zu liegen, die nach FREUDENBERG (l. c. 156) im natürlichen Milieu durch Kalkseifen stark gehemmt wird.

Gallensäuren. Dieses alte Problem der Fettverdauung ist durch diese neuen Gesichtspunkte als gelöst anzusehen, soweit es sich um den Anteil handelt, der den direkten Einfluß der Gallensalze auf die Lipasewirkung (Pankreas- und Darmlipase) betrifft. Der wesentliche Einfluß der Gallensäuren auf Emulgirung und Resorption der Fette hat damit natürlich nichts zu tun.

Im Reagensglasversuch wirken alle rein dargestellten Gallensäuren aktivirend, und zwar optimal bei einem ph von 8—9 (SHODA **153)**), aber ihre Wirkung ist quantitativ sehr verschieden. Stark aktivirend sind Cholsäure und noch mehr Desoxy-cholsäure, daran reiht sich die Urso-desoxycholsäure der Bärengalle; viel schwächer wirken Hyo-desoxycholsäure und „Gallo"-desoxych. (die mit der Cheno- und Anthropo-desoxych. identisch ist) (SHODA); ferner die aus Krötengift isolirbare Bufo-desoxych. (OKAMURA **154)**), SHODA nimmt an, daß nur diejenigen Gallensäuren stark aktiviren, die eine freie OH-Gruppe im „zweiten Ring, Position 7" enthalten (alte Formel: entspricht in der neuen Formel Ring C, Position 12).

Alte und neue Formulirung der Gallensäuren **(154a)**.

Alte Formel. Neue Formel.

Dies trifft eben für Cholsäure und Desoxych. zu, nicht für Hyo-desoxych. und Chenodesoxych. (Die Formeln für Urso- und Bufo-desoxych. sind noch nicht gesichert, sie enthalten nach ihrer schwachen Wirkung vermutlich kein OH in 12). KAZIRO **155)** hat noch mehrere andere Derivate mit gleicher Stellung der OH-Gruppe wirksam befunden: Apocholsäure, Dioxy-choladiensäure, Dioxycholensäure und ein Abbauprodukt der Urso-desoxych. FREUDENBERG **156)** hat die aktivirende Wirkung von Galle und Gallensäuren auf die Frauenmilchlipase (§ 277) untersucht. Die Aktivirung leistet dasselbe wie die durch die spezifische Kinase (s.u.). Es wirken ebenso wie bei SHODA die üblichen Gallensäuren, Choleinsäuren und Scymnol der Haifischgalle; nicht Litho- und Dehydrocholsäure, Bufotalin schwach,

153) ***M. Shoda,*** Die [H+] bei der Fettspalt. etc. Jl. of Biochem. **6,** 395; **7,** 505 (1926/7). — 154) ***T. Okamura,*** Bufo-desoxycholsäure I, Jl. of Biochem. 8, 351 (1928). — 154a) ***A. Lüttringhaus,*** Sterine und Gallensäuren, Hb. der Biochem. Erg. Werk, Bd. 1, Jena 1933. — 155) ***K. Kaziro, K. Tsuji,*** Wirkung der Apochols. auf Lipase. Jl. of Biochem. **11,** 333 (1930). — 156) ***E. Freudenberg,*** Gallenaktiv. der Prolipase der Frauenmilch. Zs. Kind. **55,** 718 (1933) S.A.

Blasengalle aller Warmblüter wirkt viel stärker als Lebergalle, ebenso Haifisch- und Steinbuttgalle, Galle von *Esox lucius* viel schwächer; am stärksten Karpfen (*Cyprinus*).

Nach AVELLONE **157)** und DI MACCO **158)** wirken im Versuch Gallensäuren auf Serumlipase (Hund) indirekt aktivirend, indem sie die Resistenz gegen Chinin erhöhen, hauptsächlich Taurocholat. Es wird dies mit dem Auftreten chininresistenter L. bei Leberschädigungen (§ 275) in Verbindung gebracht, denn auch injicirte Taurochols. soll die Serolip. chininresistent machen (BÀCULO c.s. **159)**) — Darmsaftlip. soll nach REALE (l. c. 79) durch Gallensalze gehemmt werden; dagegen fanden HERZFELD (l. c. 40a) und PIERCE c.s. **159a)** Aktivirung.

Ganz unübersichtlich sind dagegen die Wirkungen, welche die zugesetzten Gallensäuren auf die Fettspaltung im Gewebebrei ausüben. Durch ph-Verschiebungen und Eiweisspaltung in diesen autolysirenden Geweben kann oder muß das Bild völlig verzerrt werden: die Idee von IKOMA **160)**, man könnte daraus ein Bild von der Bedeutung der Gallensäuren im Gewebestoffwechsel bekommen, muß abgelehnt werden.

So sei denn nur kurz erwähnt, daß Gallensäuren am stärksten Leberbrei aktiviren, viel weniger z.B. Muskel. Cholsäure aktiviert Leberbrei bis zu 0,5 %, während diese Konz. bei anderen Organen schon hemmt. Überschüssige Gallensäuren bei Cholaemie sollen aus diesem Grunde den Fettstoffwechsel anderer Organe hemmen.

Die früheren Erklärungsversuche: Aktivirung eines „Zymogens" und „Emulgirung der Fette" sind von WILLSTÄTTER (l. c. 3) widerlegt. Die Gallensalze wirken weder als Co-Ferment, noch als Emulgens, sondern durch Herbeiführung kolloider Niederschläge mit den Proteinen, an denen dann Ferment + Substrat adsorbiert werden und aufeinander wirken als ein „komplexes Adsorbat". Und dies geschieht nur bei der natürlichen Reaktion der Pankreaslipase, also im schwach alkalischen Gebiet. Im sauren Gebiet wirkt die Pankreaslipase ebenso gut ohne Gallensalze wie im alkalischen mit ihnen, und die Gallensalze hemmen: die Wirkung der Cholate ist also keine andere wie die der Seifen, die auch nur im alkalischen Gebiet fördern. Tatsächlich wirken **Ca-Salze** genau so, weil im alkalischen Gebiet die Kalkseifen komplexe Adsorbate bilden. In beiden Fällen wird diese Komplexbildung durch Albumin (oder Globulin, PLATT u. DAWSON, l. c. 81) wesentlich verstärkt, so daß Ca-Oleat + Albumin als maximaler Aktivator praktisch angewendet wird. Auch **Aminosäuren** (DAWSON **161)**) und einige Peptide (Leucyl-glycylglycin) wirken derart im alkal. Milieu aktivirend, im sauren hemmend, nach ABDERHALDEN **162)** auch andere Polypeptide, ohne erkennbaren Einfluß der Struktur, aber nur auf Pankreaslipase.

Daraus folgt, daß eben nur solche Enzyme in ihrem natürlichen Milieu durch Gallensalze aktivirt werden, bei denen dies Milieu alkalisch ist, also vor allem die L. des Pankreas, während die im sauren wirksame Magenlipase nicht aktivirt wird, wie lange bekannt (LAQUEUR u. a.).

Daß das Milieu die Hauptbedingung ist, zeigt die im natürlichen Milieu alkalische L. des Schweinemagens, die der Aktivirung zugänglich ist (l. c. 7). Aber hier liegen insofern verwickelte Verhältnisse vor, als die Aktivirung der verschiedenen Präparate sehr ungleich ist und manchmal ganz ausbleibt. Im Schweinemagen ist nämlich mit der L. ein natürlicher Aktivator „gallenähnlicher Wirkung" vorhanden, der bei der

---

157) ***L. Avellone,*** Az. d. bile sul pot. tributirinol. etc. Riv. Pat. sper. **1,** 395 (1926); BPh **89,** 285. — 158) ***G. di Macco,*** Az. del glicocol . . . sulla sierolip. Riv. Pat. Sper. **2,** 359; BPh **44,** 129. — 159) ***A. Bàculo*** u. ***E. Jantria,*** Az. della bile . . . s. sierolip. ebd. **3,** 52; BPh **45,** 688. — 159a) ***H. B. Pierce c.s.,*** Enzymbild. im ob. Jejunum. Jl. of biol. Chem. **108,** 239; Ch. Cbl. **1935,** I, 2550. 160) ***Sh. Ikoma,*** Einfl. einiger Gallens. auf den Fettstoffw. Jl. of Biochem. **6,** 383 (1926). — 161) ***E. R. Dawson,*** The influ. of amino-acids on hydrol. by pancr. lipase. Biochem. Jl. **21,** 398 (1927). — 162) ***E. Abderhalden, W. Geitel,*** Aktiv. von Lip. durch Polypeptide. Fermentforsch. **13,** 156 (1932).

Reinigung entfernt werden kann (l. c. 7); ist er reichlich vorhanden, so ist eine zusätzliche Aktivirung nicht mehr möglich.

Dies leitet nun wieder über zu der ähnlichen Sachlage bei der in der üblichen Weise garnicht aktivirbaren Leberlipase (s. o.), die ebenfalls einen solchen natürlichen, aber viel schwerer abtrennbaren Aktivator enthält (l. c. 8). Wir haben oben die Ansicht KRAUTS wiedergegeben (l. c. 23), daß es sich hier um einen Überschuß von Pheron selbst handelt; bei der rohen Magenlipase scheint es sich also ähnlich zu verhalten, nur daß hier die Abtrennung dieses Überschusses bei der Reinigung leichter vonstatten geht.

Und endlich liegt es wohl auch bei der nicht aktivirbaren Serumlipase ganz analog; auch hier gibt es zahlreiche ältere Beobachtungen betr. einen Aktivator im Serum (und in Organen), der nun auch Pankreaslipase aktiviren und nach CORRAN und LEWIS **163)** an die Pseudoglobulin-Albuminfraktion gebunden sein soll.

FINE **164)** fand einen Aktivator im Serum von Mensch und Kuh, nicht von Ratte und *Cavia.* Hier könnte es sich also auch um zusätzliche Neubildung durch geeignete Pheron-Substanzen handeln; jedoch sind alle diese Beobachtungen nicht exakt genug, um solche Wirkungen von einfachen Aktivirungen durch Seifen zu unterscheiden. Bei Carcinom-Seren soll die Wirkung vermindert sein; Blei in jeder Form erhöht sie **(163)**. Bleiwirkung bestätigt WOODHOUSE **165)**, Verminderung bei Tumorkranken nicht, Tumorkranken-Serum wirkt genau wie normales.

In diese Gruppe von Aktivatoren gehört auch das höchst überflüssigerweise mit dem besonderen Namen bezeichnete Javanin, das zuerst aus Pankreas (Fällung mit $FeCl_3$, Alkoholextraktion), dann auch aus Serum gewonnen wurde **(167)**. Es ist natürlich ein undefinirbares Gemisch von Aminosäuren, Seifen und vielleicht Gallensalzen. Javanin soll „inaktive" L. aus Pankreas und vor allem aus Serum durch spezifische Bindung, wie Ambozeptor + Komplement, aktiviren. Das Javanin wird zum „Hormon des Fettstoffwechsels" ernannt, das Pankreas soll dadurch („Sensibilisirung der Lipoide") den „parenteralen Fettstoffwechsel" regulieren. Ungefähr dasselbe wird der Aktivator sein, den WATERMANN **168), 169)** aus Milz und zerfallenem Tumorgewebe isolirt, aber auch im Serum gefunden hat, wahrscheinlich Eiweisspaltprodukte. Mit Lipase zusammen bringt er Krebszellen zum Zerfall. Er ist empfindlich gegen Bestrahlung und wird mit der Strahlenwirkung in Zusammenhang gebracht. Der Aktivator kann durch Röntgenstrahlen ebenso periodisch verstärkt oder geschwächt werden wie die „P/W Konstante" (Polarisationswiderstand/OHMscher Widerstand); dadurch wird die Fettspaltung in der Zelle und dadurch endlich die Struktur der oberflächenbildenden Emulsionen (Eiweiss in Lipoid oder Lipoid in Eiweiß) mit ihren entscheidenden Rückwirkungen auf den Zellstoffwechsel beeinflußt. Außerdem findet sich noch ein Anteil dieses Aktivatorgemisches, der strahlenunempfindlich ist und direkt auf die Emulsionen einwirkt. — Milzextrakte haben im Zusammenhang mit diesen Ideen betrachtet eine gewisse vorbeugende Wirkung bei Teertumoren.

Die Lipokinase FREUDENBERGS werden wir unten anläßlich der Zymogenfrage mit behandeln.

Das angebliche Zymogen. Auf solche Möglichkeiten, einen sehr stark wirksamen natürlichen sozusagen „Aktivator" abzutrennen, beruhen wenigstens teilweise die seit altersher immer wiederkehrenden Behauptungen, daß es eine „Umwandlung" eines Zymogens in aktive Lipase gäbe. Daß man dies nicht mehr so auffaßt, hängt ja mit der allgemeinen Umformung des alten Zymogenbegriffes zusammen. Man denkt ja nicht mehr an die „Umwandlung einer Vorstufe", sondern an ein System bestehend aus dem fertigen Enzym, aber in relativ unwirksamen Zustande, einem „Apo-Enzym", und

---

163) ***R. F. Corran, W. C. Mc. Lewis,*** Effect of serum on lipase act. Biochem. Jl. **22,** 451 (1928), **23,** 188 (1929). — 164) ***J. Fine,*** On ... enz. accel. ... in serum. Biochem. Jl. **24,** 1282 (1930). — 165) ***D. L. Woodhouse,*** Activ. of pancr. lip. Biochem. Jl. **26,** 1512 (1932). — 167) ***P. H. Pock-Steen, G. E. Tuxen,*** Res. conc. ... a lipoclastic activator (Javanin). Act. Path. Skand. **3,** 681; **4,** 121 (1926/7); BPh **41,** 584; **43,** 600. — 168) ***N. Watermann,*** Zellstruktur, Strahlung und Fermente. Protoplasma **12,** 112 (1931) S.A. — 169) ***N. Watermann,*** Analyse der Tumor-resistenz. Zs. Krebsf. **34,** 313, 327 (1931), **40,** 377 (1934) S.A.

Abgeschlossen: 20. Mai 1935. Ber. Phys. 84, H. 7/8.

einem Aktivator. In die Gedankengänge KRAUTS (l. c. 23) übersetzt, kann man dies wie folgt ausdrücken: man kann natürlich vorfinden oder künstlich herstellen ein Enzym-System, das wegen Mangels an geeignetem Pheron schwach oder kaum wirksam ist, und kann durch Zusatz eines ebenfalls unwirksamen Stoffes, der Pheron enthält, eine manifeste Wirkung herbeiführen. Den ersten Fall, Vorfinden eines ungemein aktivirungsfähigen „Zymogens" hat BAMANN (l. c. 34, 35) bei der Lyolipase des Pankreas beobachtet, die durch ausgleichende Aktivirung bis zu 9000 % aktivirt werden kann.
Um den zweiten Fall, künstliche Schaffung eines Zymogens, drehen sich die vielfachen Versuche, aus wirksamen Lipasepräparaten zwei relativ unwirksame, erst bei der Vereinigung stark wirksame Anteile darzustellen. Eine solche Trennung in unwirksames Enzym und unwirksamen Aktivator hatte zuerst UMEDA (*l. c. 50*) angegeben: Ultrafiltration ergab ein inaktives Enzym und ein thermostabiles „**Co-Enzym**". FUJIHARA **170)** erzielte dann die Isolirung des Aktivators durch Erhitzen auf 70°, NOYES und FALK **171)** unvollkommen durch Dialyse. Nach FUJIHARA können auch Gallensalze dialysirte Lipase aktiviren.

Bei der Inaktivirung durch Dialyse handelt es sich nach BOSMAN **172)** um Salzwirkungen, wohl hauptsächlich ph-Regulierung; denn die bei der Dialyse stark geschwächte Lipase kann durch Zugabe der (enzymfreien) Außenflüssigkeit oder ihres veraschten Rückstandes oder von deren hauptsächlichsten Bestandteilen: Natriumkarbonat und Phosphat wieder die ursprüngliche Wirksamkeit erlangen; im übrigen widerspricht dies älteren Beobachtungen von WILLSTÄTTER **173)**.

Später gab GYOTOKU **174)**, **175)** an, eine Trennung in zwei an sich fast unwirksame Bestandteile bei der (chininfesten) L. des Schweinemagens durch Fällung mit Chinin erzielt zu haben. Niederschlag und Filtrat enthalten nur $^1/_3$—$^1/_{10}$ der Fermentmenge, die nach der Wiedervereinigung sich ergibt, und zwar sofort. Ähnlich verhält sich Pankreaslipase; die beiden Fraktionen können auch gekreuzt werden: „Zymogen" von Magenlip. mit „Coferment" von Pankreas und umgekehrt. Die Vereinigung geschieht in stöchiometrischen Verhältnissen. Beide Anteile sind thermolabil. Ob nun hier ein echtes Zymogen vorliegt, läßt GYOTOKU offen. Er glaubt aber, daß auch hier eine an sich gegebene schwach wirksame Lipase einfach aktivirt wird. Die Versuche besagen ungefähr dasselbe wie die „Synthese" von Leberlipase aus Pankreaslipase durch KRAUT (l. c. 23).

Demgegenüber steht FREUDENBERG **176)** für die allerdings etwas Besonderes darstellende L. der Frauenmilch (§ 277) auf dem Standpunkt, daß die frische Milch ein echtes Proferment enthält. Es bleibt bei der Labung in der Molke, gebunden an das Globulin, läßt sich von diesem ablösen, bleibt inaktiv und kann in diesem vorgereinigten Zustande aktivirt werden, einerseits durch Gallensalze (l. c. 156), andererseits durch einen besonderen, nur im Magen vorkommenden Aktivator, die **Lipokinase**, die aus der Schleimhaut extrahirbar ist und auch in den Magensaft übergeht. Diese Kinase ist eine thermolabile, alkohol-

---

170) ***M. Fujihara,*** Action of pancr. lip. (jap.). BPh **35**, 727. — 171) ***H. M. Noyes, J. Lorberblatt, K. G. Falk,*** Ester hydrol. act. of the whole eel. Jl. of gen. Phys. **10**, 1 (1927). — 172) ***L. P. Bosman,*** Nature of coenz. of lipase. Trans. Roy. Soc. South Afr. **14**, 255; BPh **42**, 150. — 173) ***R. Willstätter c. s.,*** Über Pankreaslip. Zs. phys. Chem. **125**, 132 (1923) u. zw. S. 153. — 174) ***K. Gyotoku,*** Studien über Lip. Proc. Imp. Acad. Tokyo **4**, 503 (1928); Biochem. Zs. **217**, 279 (1930). — 175) ***K. Gyotoku, S. Terashima,*** Lipase VI. Biochem. Zs. **217**, 306 (1930). — 176) ***E. Freudenberg,*** Verdau. Phys. des Säuglings. Zs. Kindhlk. **43**, 430; **46**, 170 (1927/8) S.A.

unlösliche, nicht diffusible, an Cellulose adsorbirbare Substanz, die bei ph = 8 irreversibel zerstört wird. Ohne diese Kinase ist die L. fast völlig inaktiv. Die Kinase ist aber andererseits zu ersetzen durch Oxydationsprodukte der Fettsäuren etc. Näh. § 277. Da die Gallensäuren genau dasselbe leisten, so ist es schwer einzusehen, warum hier noch ein zweiter ganz anders wirkender Mechanismus vorhanden sein soll; es wird sich auch hier wohl nur um Verschiebungen im System der Hemmungskörper handeln. Im Einzelnen ist die Deutung der an sich sehr sorgfältigen Versuche noch zweifelhaft, da es sich hier anscheinend nicht um Zufuhr von Pheron handelt.

Nach REMESOW **177)** lassen sich diese unklaren Dinge für die Serumlipase wenigstens z. T. darauf zurückführen, daß sehr häufig die L. durch Bindung an Cholesterol und auch Lecithin maskiert ist, weil die Lipoide das Enzym durch Adsorption — bis auf einen geringen Rest, unter 20 % — unwirksam machen, aber nur in vivo, nicht in vitro **(178)**; hier liegt geradezu ein künstliches Zymogen vor, das durch Zerlegung des Adsorbates, so durch Phosphate, Calciumoleat, auch koll. Nickel, „aktivirt" werden kann; hier laufen also die Befunde irgendwie zusammen mit den oben genannten „Aktivatoren" des Serums. Interessant ist, daß nach GRUZEWSKA **179)** sich diese Hemmung durch Serumkolloide ganz spontan lockern kann. Sie beobachtete an Serum im Eisschrank erst eine Abnahme (2 Monate), dann aber wieder eine Zunahme der lipat. Wirkung ganz entsprechend einer „Spontanaktivirung". REMESOW konnte solche Lipasehemmungen im Blute bei Kaninchen künstlich erzeugen, wenn er ihnen große Mengen in Öl gelöstes Cholesterol per os zuführte oder kolloides Cholesterol intravenös. Ebenso aber treten Hemmungen bei von selbst entstandenen Hypercholesterinämien auf (§ 274). Am stärksten hemmen die Cholesterol-Ester. (Näh. § 275).

Antilipase. Von den älteren Befunden einer wahrhaften Immun-antilipase war es still geworden. Neuerdings hat NITZESCU **180)** Versuche mitgeteilt, die aber auch nach seiner eigenen Ansicht die Frage nicht klären. Er fand nach Injektionen von Lipase im Kaninchenserum eine wesentliche Hemmung der Tributyrinspaltung; es blieben 67 % ungespalten gegen 11 % der Kontrollen. Eine Antilipase gegen Pankreasl. (Schwein) will BALÓ **181)** beim Kaninchen erzeugt haben.

5) Spezifische Wirkungen.

§ 268. Das Verhalten der verschiedenen tierischen Lipasen gegen bestimmte einzelne Gruppen von Estern hat seit den ersten exakteren Arbeiten über diese Enzyme stets das Interesse wachgehalten. Abgesehen von der physiologischen Bedeutung (Verhalten der Verdauungsfermente gegenüber den Stoffwechselfermenten) trat besonders die Frage in den Vordergrund, ob die auf den ersten Blick so scharfen Unterschiede zwischen eigentlichen „Lipasen" mit betonter Wirkung auf echte Fette und den „Esterasen" mit betonter Wirkung auf einfachere Ester das Vorhandensein verschiedener Enzyme erweisen. Wir haben schon § 261 das Ergebnis der WILLSTÄTTER-

---

177) ***J. Remesow,*** Stud. über den Lipoidstoffwechsel. Arch. Phys. (PFLÜGER) **221,** 533 (1929) S.A. — 178) ***J. Remesow c. s.,*** Blutlipase etc. Zs. exp. Med. **87,** 613 (1933) S.A. — 179) ***Z. Gruzewska, M. G. Roussel,*** Activ. de la lip. du sérum. Ann. de Physiol. **9,** 369 (1933); BPh **75,** 727. — 180) ***J. J. Nitzescu, G. Benetato,*** Form. d'antilip. Soc. Biol. **111,** 341 (1932); BPh **71,** 122. — 181) ***J. Baló, E. Bach,*** Einfl. intraven, verabr. Pankr.-Lip. etc. Zs. exp. Med. **75,** 583 (1930).

schen Arbeiten vorweggenommen, daß es nicht notwendig ist, hier strukturell verschiedene Enzymtypen anzunehmen, daß man vielmehr mit der Annahme verschiedener relativer Spezifitäten auskommt, die bedingt sind durch die Ungleichartigkeit der Systeme in ihrem Gehalt an Begleitstoffen. Allerdings handelt es sich hier nicht oder nicht vorwiegend um ganz gleichgiltige, leicht abtrennbare Begleitstoffe; denn diese Verschiedenheiten in der Wirkung bleiben in weiterem Ausmaße bestehen, wenn man Reinpräparate darstellt. Es ist noch nicht sicher zu entscheiden, ob und in wie weit die Begleitstoffe, welche die Wirkungsdifferenzen bedingen, unmittelbar zum System „Enzym", d. h. dem Symplex Wirkgruppe + Träger gehören, also unmittelbare Bestandteile des Pheron sind; aber zum mindesten sind sie immerhin der zweiten Sphäre der Zugehörigkeit zuzuschreiben: sie sind nicht ohne Weiteres abzuscheiden, vielleicht überhaupt nicht ohne Verlust der Stabilität. Es ist also auch hier noch wieder das eigentliche System „Enzym" organisch verbunden mit weiteren kolloiden Systemen, wie dies WILLSTÄTTER **182)** ja nun fast allgemein annimmt, vgl. die Ausführungen über Lyo- und Desmolipasen § 263, und die „Einführung" zum Gesamtwerk.

Außer den älteren Befunden sind auch einige der WILLSTÄTTERschen exakten Messungen **183)** schon im H.W. berücksichtigt worden; es seien die Hauptpunkte wiederholt, um den Anschluß zu finden.

Die beiden Hauptgruppen sind die Typen der Pankreaslipase und der Leberlipase, die sich auch chemisch am stärksten in bezug auf „System" und „Begleitstoffe" unterscheiden (§ 263). Die eine ist charakterisirt durch betonte Wirkung auf Fette, die andere durch Wirkung auf niedere Ester (Methylbutyrat), Tributyrinspaltung liegt in der Mitte. An die Pankreaslipase schließen sich an die des Magens (l. c. 9), der Leucocyten, der Frauenmilch und des Fettgewebes; an die Leberlipase die des Darmes, des Blutes und der Organzellen.

Das quantitative Ausmaß dieser Wirkungsdifferenzen an einem besonders günstigen Beispiel zeigt folgende Gegenüberstellung: Um dieselbe Spaltung zu erzielen wie durch 1 g Pankreastrockenpräparat (Schwein) wären nötig von einem Trockenpräparat der Schweineleber

für die Ölspaltung	10600	g
für die Tributyrinspaltung	100	g
für die Methylbutyratspaltung	0,4	g

So entschieden liegen die Verhältnisse aber durchaus nicht immer. Wenn man nämlich — bei Reinpräparaten mit an sich reproducirbarer Wirkung — auch noch die verschiedenen Tierarten in Rechnung stellt, so ergeben sich viel komplicirtere Beziehungen. So sind nach BAMANN **184)** die Leberlipasen verschiedener Tiere auch nicht annähernd von gleicher Wirkung auf niedere Ester (Methylbutyrat); es zeigen sich Differenzen gleicher Größenordnung wie beim gleichen Tier (Schwein) zwischen den Enzymen von Leber und Pankreas. Seltsamerweise greift Takalipase Butyrate fast garnicht an (WILLSTÄTTER, l. c. 218).

Es liegt also ein ungeheures Feld für Einzelbeobachtungen vor, da nicht nur die

---

182) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Enzyme der Leucocyten VI—IX. Zs. phys. Chem. **203**, 189; **204**, 181; **209**, 32; **218**, 77; **221**, 202, s.a. dieselb. ebd. **208**, 258, (1931—33) und weitere principielle Ausführungen ebd. **229**, 241 (1934). — 183) ***R. Willstätter, F. Memmen,*** Vergleich von Leberesterase mit Pankr.-Lip. Zs. phys. Chem. **138**, 216 (1924). — 184) ***E. Bamann, M. Schmeller,*** Kinet. der Esterhydrolyse, Zs. phys. Chem. **183**, 149 (1929).

Spaltung desselben Esters durch alle möglichen artverschiedenen und organverschiedenen Enzyme, sondern umgekehrt auch die Wirkung des gleichen Enzyms auf die verschiedensten Ester einfacher Alkohole, Glyceride, aromatische und Cholesterinester zu untersuchen ist. Ein besonderes Kapitel von hohem theoretischen Interesse ist noch das Verhalten sterisch verschiedener Ester, auf das wir gesondert zurückkommen (§ 269).

Davon abgesehen ist das Verhalten zahlreicher Ester besonders gegen Pankreaslipase geprüft worden, worüber bereits im H.W. berichtet ist.

Es lassen sich aus den Einzelangaben etwa folgende Regeln entnehmen:

Monocarbonsäuren: bei niederen Estern mit einfachen Alkoholen sind die der Isosäuren schwerer spaltbar (l. c. 6). Bei Glyceriden steigt die Spaltbarkeit mit der Länge der Fettsäuren und ihrer Anzahl im Glycerid; Triglyceride sind leichter spaltbar als Di- und Monoglyceride. Ungesättigte Säuren erhöhen die Spaltbarkeit, aber nur die mit längerer Kette, Aethylcrotonat ist nach KERNOT **185)** schwer spaltbar. Die schon früher festgestellte Tatsache, daß die bessere Spaltbarkeit der ungesättigten Fette nur vom Schmelzpunkte abhängig ist, wird in Versuchen an künstlich „gehärteten" Ölen (Wal-, Soja-Öl) bestätigt **(186)**.

Oxysäuren: Milchsäure-Ester werden ebenso schnell zerlegt, wie Butyrate (Alkohole bis Capryl) (MURACHI **187)**). Dagegen werden die Ester unspaltbar, wenn man das alkoholische OH der Säure durch Acyl-Substitution bindet, so der Acetyl-mandelsäure, Acetyl-salicylsäure, Salicylo-salicylsäure, Lactyl-milchsäure (BAMANN **188)**), weil das neu eintretende benachbarte Carboxyl die Affinität aufhebt.

Ketonsäuren verhalten sich auffallend verschieden: Leberl. spaltet Ester der Benzoyl-ameisensäure kaum, Benzoyl-essigsäure sehr schnell, schneller als Mandels.-Ester. **(190)**.

Die esterartigen Anhydride der Oxysäuren vom Typus Milchsäure-lactid sind bis auf dieses selbst unspaltbar (Diphenyl-glykolid, Benzilid, Tetrasalicylid); ebenso die Lactone der Oxysäuren (γ-Oxybuttersäure, γ-Oxyvaleriansäure, Cumarin, Santonin). Die Ursachen der Resistenz sind aber verschieden: Die Esteranhydride haben keine Affinität zum Enzym. Die Lactone haben dagegen eine starke Affinität und binden das Enzym, aber die Zwischenverbindung zeigt keine meßbare Zerfallsgeschwindigkeit, die Lactone hemmen also andere Hydrolysen (BAMANN **189)**) ebenso wie einige Ketocarbonsäuren (§ 266) **(190)**.

Zweibasische Säuren: Die Di-Ester der niederen Säuren werden nur halb gespalten, der entstehende Mono-Ester ist resistent, weil die benachbarte Carboxylgruppe die Affinität vernichtet (BAMANN **188)**). Dies ist für Oxal-, Bernstein- und Fumarsäure lange bekannt und für Malonsäure von Mc. GINTY **191)** bestätigt. Dabei wird der erste Alkohol bei Diaethylfumarat schneller abgespalten als bei Maleinat, bei Succinat schneller als bei Malat (Mc. GINTY). Ist die hemmende Carboxylgruppe weiter entfernt, bei längeren Ketten von der Glutaminsäure und Adipinsäure an, wird auch der zweite Alkohol glatt abgespalten (WESTENBRINK **192)**).

Über die Wirkung von Leberlipase und anderen Organlipasen auf verschiedene Ester finden sich in den einzelnen Arbeiten (§§ 274 ff) allerlei Angaben, die einzeln aufzuführen ohne Interesse wäre, da sie weder theoretisch noch biologisch bestimmte Gesichtspunkte ergeben.

---

185) ***J. C. Kernot, H. W. Hills,*** Hemm. prim. Alkohole auf Lip. Zs. phys. Chem. **222,** 11 (1933) S.A. — 186) ***F. Tofte,*** Spaltung gehärt. Öle durch Pankr.-Lip. Biochem. Zs. **272,** 308 (1934) S.A. — 187) ***R. Murachi,*** Wirk. der Pankr. Lip. auf Oxysäure-Ester. Act. Schol. Med. Kyoto **7,** 369, 377 (1925); BPh **34,** 879. — 188) ***E. Bamann c. s.,*** Verh. der Esterasen geg. Esteranhydr. etc. Zs. phys. Chem. **222,** 121 (1933) S.A. — 189) ***E. Bamann, M. Schmeller,*** Verh. der Esterasen geg. Laktone. Zs. phys. Chem. **194,** 14 (1931). — 190) ***E. Bamann, M. Schmeller,*** Reakt. Verlauf d. Spaltung von Gemischen aus Mandelsäureester etc. Zs. phys. Chem. **188,** 251 (1930). — 191) ***D. A. Mc. Ginty, H. B. Lewis,*** Lipase Studies III. Jl. of biol. chem. **67,** 567 (1926). — 192) ***W. G. K. Westenbrink, H. M. Romijn,*** Influ. of [H+] on the act. of liver lip. Arch. Néerland. Phys. **15,** 529 (1930) S.A.

Hierzu sei erwähnt, daß K. G. FALK 193) in einer Reihe von Arbeiten die Wirkung von Extrakten ganzer Tiere, sowie deren Embryonen und Tumoren immer auf dieselben zehn Ester verglichen hat, so von Maus, Ratte, Kaninchen, Aal, Forelle etc. Er will daraus gewisse Gruppenspezifitäten ableiten, was hier im Einzelnen nicht berichtet werden kann. Weiter hat er Versuche angestellt über Mischungen von Organextrakten untereinander und mit Tumorextrakten (194). Er findet dabei eine Herabsetzung der Wirkung der Gemische gegenüber den einzelnen Komponenten, die er zu erklären versucht. Die Methode FALKS wird von BECKMANN 195) als irreführend abgelehnt. Neuerdings hat FALK in analoger Weise Sera (Ratte, Pferd, Schaf, Mensch, Rind) und Plasma (Schaf) an 10 Estern untersucht (196).

Aromatische Ester. Für deren Spaltung hatte man früher z. T. eigene Enzyme angenommen; jedoch ist dies nicht notwendig, da ja alle Übergänge von rein aliphatischen Estern über gemischte fett-aromatische wie Aethylbenzoat zu rein aromatischen Estern führen.

Über die relative Angreifbarkeit dieser Ester, insbesondere des Salols (Salicylsäure-Phenylester) konnte man sich früher durchaus nicht einig werden; während einige Autoren eine eigene „**Salolase**" annahmen, vermißten andere die Spaltbarkeit ganz. Auch heute noch sind diese Unklarheiten nicht beseitigt. Indessen kann man jedenfalls als sicher annehmen, daß alle Ester, die eine aromatische Komponente, ob Säure oder Alkohol, enthalten, durch Leberlipase viel langsamer zerlegt werden, als die rein aliphatischen, und daß dementsp. Salol kaum noch angegriffen wird, weil hier eben beide Komponenten aromatisch sind (BAMANN, l. c. 188). Wahrscheinlich liegt hier eine Affinitätsverminderung vor. Hier liegen auch die Unterschiede gegenüber der durchaus spezifischen Wirkung der Tannase (§ 281).

Betreffend die Struktur der Säuren stimmt BAMANN mit einer älteren Arbeit von YOSHIMATSU 197) überein, daß Salicylate langsamer als Benzoate zerlegt werden, dagegen nicht mit dessen Behauptung, daß Phenylester schneller als Isobutyl-, Amyl- und Glycerinester angegriffen werden. — Lip. von *Potamobius* spaltet nach KRÜGER (l. c. 67) nicht die Ester von Benzoesäure und Salicyls. wohl aber die Phenyl- und Benzylester der Essigsäure, Salol fraglich. Die Wirkung auf Phenylacetat schwankt unabhängig von der auf Methylbutyrat.

Betr. der einzelnen Lip. gibt YOSHIMATSU noch an, daß sie in folgender Reihe absteigend wirken: Leber, Niere, Muskel, Milz, Pankreas.

Die L. zerlegen auch die Tropeine, die Ester der Tropine mit aromatischen Säuren. So gelang es WILLSTÄTTER c. s. 197a), aus Scopolamin das primäre Spaltprodukt Scopin durch Pankreaslipase zu erhalten; es zeigte sich aber, dass diese Hydrolyse bei ph = 9 auch ohne Enzym vonstatten geht.

Eine Angabe von HANKE 198), daß in Tiergeweben ein Enzym **Chloro-Esterase** vorkommt, das Alkylchloride unter Freisetzung von Säure spaltet, ist vereinzelt geblieben, auch HANKE selbst ist nicht darauf zurückgekommen. Es ist besonders in Leber und Magen gefunden, soll irgendwie mit der HCl-Produktion im Magensaft zusammenhängen.

Die enzymatische Zerlegung echter **Wachse**, d. h. der Ester höherer Fettsäuren mit (meist gleichzähligen) höheren Alkoholen, ist noch nicht sichergestellt. Im allgemeinen scheinen diese Wachse, die ja keine Stoffwechselsubstrate, sondern Schutz- und Deckstoffe sind, unangreifbar zu sein. Eine wahrhafte **Cerase** scheint nicht zu existiren.

---

193) ***K. G. Falk, H. M. Noyes c. s.,*** Lipase actions etc. Jl. of gen. Phys. **8**, 75 (Ratte), **9**, 129, 651 (do, Tumoren, Embryo), 837, 845 (Forelle), **10**, 1 (Aal) 359 (Maus). — 194) ***K. G. Falk c. s.,*** Stud. of enz. act. 25—27. Jl. of biol. chem. **39**, 183, 213, 225 (1924). — 195) ***H. Beckmann,*** A crit. of the lip. „picture"-method. Jl. of Lab. and Clin. Med. **13**, 214 (1927); BPh **45**, 268. — 196) ***K. G. Falk, Grace Mc. Guire,*** Stud. of enzyme act. 47, 48. Jl. of biol. chem. **105**, 373, 378 (1934). — 197) ***G. Yoshimatsu,*** Verh. arom. Ester gegen Organausz. I—III Acta schol. Med. Kyoto **11**, 599; BPh **51**, 790. — 197a) ***R. Willstätter, E. Berner,*** Hydrol. des Scopolamins. Ber. Chem. Ges. **56**, 1079 (1923); Willst. Fermente S. 1451. — 198) ***M. E. Hanke,*** A new acid-forming enz. etc. Jl. of biol. chem. **67**, XI (1926).

Eine umfängliche Diskussion hat sich eigentlich nur über die Frage entwickelt, ob das „Wachs" der Tuberkelbazillen in tierischen Geweben enzymatisch angreifbar ist, seitdem FIESSINGER (*l. c. 186*) ein solches Enzym in der wachsfressenden Motte *Galleria melonella* gefunden hatte, das (s. u.) wahrscheinlich garnicht vorhanden ist. Man geht von der Vorstellung aus, daß es grade die schwer angreifbare Wachshülle der Tbc-Bacillen ist, die wesentlich zu der Resistenz dieser Bacillen im Tierkörper und ihrer schweren Beeinflußbarkeit durch immunbiologische Schutz- und Abwehrvorrichtungen beiträgt.

Dieses „Tuberkelwachs" besteht aus Estern eigenartiger hochmolekularer Fettsäuren mit anscheinend verzweigter Kette, von denen ANDERSON und CHARGAFF **199)** bisher die Tuberculostearinsäure C_{18} und die Phthionsäure C_{26} näher untersucht haben.

Die Beziehungen zwischen Tbc. und Lipasen sind nun einerseits darin gesehen worden, daß von Tbc. befallene Tiere und Menschen in Blut und Organen auffallend arm an Lipasen sind, daß also die „Disposition" zu Tbc. mit diesem primären Defekt zusammenhängt. Darauf werden wir § 275 zurückkommen.

Ferner aber sind umgekehrt Versuche darüber angestellt worden, ob und in wieweit lipatische Enzyme auf die Wachshülle der Bakterien zerlegend wirken.

Von der Annahme ausgehend, daß dadurch die Bakterien leichter angreifbar werden, andererseits aber eben dadurch eher die Ausbildung von spezifischen Antikörpern veranlassen, sind mit Tbc.-Bakterien eine Reihe von Versuchen in immunbiologischer Richtung gemacht worden, die irgendwie mit Lipasen sei es von *Galleria*, sei es anderen in Beziehung gebracht werden.

So berichteten BERG **200)** (Pankreasferment), KANÓCZ (Lungenlipase **201)**, CAPPELLI (pflanzl. L.) **202)** und PERTZOFF (*Galleria*-lipase) **203)** über Zerfall, resp. morphologische Veränderungen (Granulabildung, Verlust der Säurefestigkeit) an Tbc.-Bakt. nach Behandlung mit Lipasen. Sie scheinen dadurch sowohl in ihrer Vitalität wie in ihrer Aggressivität geschwächt zu werden, denn GHIRON **204)** findet vermindertes und verändertes Wachstum von Tuberkelbazillen auf Kulturmedien, denen Leberesterase-Präparate verschiedener Tiere zugesetzt waren. Enzymhaltige Bouillonkulturen von Tuberkelbazillen wurden von Meerschweinchen im Gegensatz zu nicht enzymhaltigen Kulturen selbst bei wiederholter Inokulation ohne Schaden vertragen.

ROBINOWITSCH **205)** und KANÓCZ **201)** wollen sogar mit solchen Bakterien Schutzimpfungen und therapeutische Beeinflussungen herbeigeführt haben; und nach CAPPELLI **202)** soll zu alledem noch Zufuhr von Lipase an sich heilend auf verschiedene Formen von menschlicher Tbc. wirken.

Wir haben es hier natürlich nicht mit einer Kritik an derartigen phantasievollen Versuchen zu tun: wir müssen hier nur betonen, daß sie für die experimentelle Förderung der Enzymforschung garnichts bedeuten.

Eine Aufklärung dieser gewiß interessanten Zusammenhänge kann erst dann erwachsen, wenn die Vorfrage exakt beantwortet sein wird, wie denn tatsächlich Lipasen an sich auf das Tbc-Wachs an sich wirken. Diese Versuche sind von KRAUT **206)** in Angriff genommen worden. Er fand eine geringfügige Spaltung des die Wachse enthal-

---

199) ***R. J. Anderson, E. Chargaff,*** Lipoids of Tubercle Bac. Jl. of biol. Chem. **84,** 703; **85,** 77 (1929); Zs. phys. Chem. **191,** 157 (1930); Jl. of biol. Chem. **89,** 611; **90,** 33 (1931). — 200) ***W. N. Berg,*** Eff. of pancr. enz. on the tbc. bact. Jl. of Bact. **24,** 341 (1932), BPh **72,** 165. — 201) ***D. Kanósz,*** Das aus Meerschweinchenlunge gewonn. fettspalt. F. Zs. Tuberk. **53,** 124 (1929); BPh **52,** 159. — 202) ***G. Cappelli,*** Stud. s. lip. II. Giorn. Med. milit. **73,** 181; BPh **36,** 881; Lo Sper. **80** (1926). — 203) ***V. Pertzoff,*** Lipase ... de Galleria C. R., **187,** 253 (1928). — 204) ***M. Ghiron,*** Enzymes and immunity. Jl. of trop. Med. **34,** 164 (1931). — 205) ***L. G. Robinowitch,*** Chem. basis for the treatm. of Tbc. Chem. News **126,** 369 (1923). — 206) ***H. Kraut, H. Burger,*** Über die Spaltbark. v. Tuberkelfett durch Lipasen. Zs. phys. Chem. **209,** 49 (1932) S.A.

tenden Anteils des Tbc-Fettes durch Serumlipasen, die gehemmt wird durch starke Affinität des Fettes zur Lipase bei geringer Zerfallsgeschwindigkeit der Verbindung. Vor allem aber hat KRAUT 207) das Fundament der ganzen Theorie erschüttert. Nachdem schon DICKMAN 208) bei *Galleria* die tatsächliche Verdauung von Wachsen, auch Tbc-Wachs, zwar bestätigt, aber auf Darmbakterien bezogen hat, da er mit dem Extrakt der Larven keinerlei Wirkung gefunden hatte, fand KRAUT in Extrakten zwar starke Lipase-, aber keinerlei „Cerase"-Wirkung. Eine Organwirkung durch eine „Desmocerase" ist nicht auszuschließen, aber auch nicht nachzuweisen. Auch RORDORF 209) fand bei Extrakten aus gesunden oder tuberkulösen Lungen, daß die an sich stark wirksame Lipase die Fettstoffe der Tbc-Bacillen nicht angreift.

Demgegenüber gibt GHIRON 210) an, daß Leberlipase nur von tuberkulösen Schweinen Olivenöl und das besonders vorbehandelte Wachs der Tbc-Bacillen spaltet.

Cholesterolester werden dagegen durch Pankreaslipase, Darmsekrete und sicherlich auch in den Organen enzymatisch gespalten; es liegt indessen im Gegensatz zu älteren Annahmen keine Notwendigkeit vor, eine spezifische „Cholesterase" anzunehmen (THANNHAUSER 211)).

Befunde NOMURAS 212), daß angeblich Blut Cholesterinester nicht zerlegt, sind entweder irrig oder durch irgend welche Hemmungen zu erklären, z.B. durch eine inaktivirende Adsorption an Cholesterol, wie sie REMESOW 213) bei Hypercholestesterinaemie beobachtete, bei der die Serumlipase fast völlig verschwindet. Sie ist durch Phosphat in Freiheit zu setzen. Jedenfalls ist im normalen Serum „Cholesterase" vorhanden (§ 274).

Mitogenetische Strahlung. Bei der Wirkung von L. auf Substrate sollen besondere sonst nicht beobachtete Strahlen ausgesandt werden (BRAUN 213a)).

§ 269. Konfigurationsspecifität. Asymmetrische Spaltung 214). Ein sehr interessantes Phänomen ist die einseitige Bevorzugung eines der beiden optischen Antipoden aktiver Säureester, sei es in reiner Form, sei es durch Spaltung aus den racemischen Gemischen heraus. Bei der genaueren Untersuchung der Erscheinungen haben sich recht verwickelte Verhältnisse herausgestellt, die tief in das Gebiet der relativen Spezifität und der Affinitätsbeziehungen zwischen Enzym und Substrat hineinführen. Auf diese Fragen der Kinetik kann hier in Einzelheiten nicht eingegangen werden; hier kann nur ein kurzer Überblick über die Erscheinungen an sich gegeben werden. Es handelt sich stets um Geschwindigkeitsunterschiede in der Hydrolyse, die aber bisweilen so groß werden, daß in kurzen Zeiten praktisch nur der eine Antipode angegriffen wird. Entdeckt wurde das Phänomen durch H. D. DAKIN 1903, der nach der Wirkung von Leberlipase (Schwein) auf racemische Ester der Mandel-

---

207) ***H. Kraut, H. Burger c.s.,*** Cerase der Wachsmottenraupe. Biochem. Zs. **269**, 205 (1934) S.A. — 208) ***A. Dickman,*** Stud. on ... Galleria, Jl. of cell. Phys. **3**, 223 (1933); BPh **76**, 439. — 209) ***R. Rordorf,*** Az. di lip. ... sui lipidi dei bac. tuberc. Boll. Soc. Ital. Biol. **9**, H. 8 (1934) S.A. Arch. di Sci. biol. **20**, H. 5. (1934) S.A. — 210) ***M. Ghiron,*** Fettspalt. Eigensch. der Leber etc. Ferm. F. **14**, 182 (1934). — 211) ***S. J. Thannhauser c.s.,*** Cholest. Stoffw.-D. Arch. klin. Med. **141**, 290 (1923). — 212) ***T. Nomura,*** Cholesterase im Blutserum. Tohoku Jl. of exp. med. **4** 677 (1924); Ber. Phys. **27**, 198. — 213) ***J. Remesow,*** Blut bei der Cholesterin-Atheroskl. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **221**, 534 S.A. — 213a) ***A. D. Braun,*** Lipolysis as a source of mitogen. rad. Nature **1934**, II, 536. — 214) ***P. Rona*** und ***R. Ammon,*** Die Stereoch. Spez. der Esterasen etc. Erg. Enzymf. II, 50 (1933).

säure optisch-aktive Spaltprodukte erhielt, und zwar blieb der d (—) Ester *) unzerlegt, während der l-(+)-Ester gespalten wurde. Nur viel langsamer wurde auch der Antipode gespalten. Das Leberenzym des Schweines ist also „links-orientirt", wenn man die wahre Konfiguration, nicht die — an sich gleichgiltige — Drehungsrichtung zugrunde legt; z. B. spaltet dasselbe Enzym bei Phenyl-chloressigsäure die sterisch entsprechende l (—)-Säure schneller.

Die Erscheinung dieser asymmetrischen Hydrolyse ließ sich bei den verschiedensten Arten von Estern nachweisen, auch bei optisch aktiven Glyceriden, bei Lecithinen, bei Milchsäure-Estern, bei Estern von Aminosäuren und Dipeptiden. Im allgemeinen werden die im racemischen Gemisch schneller hydrolysirten Ester auch im isolierten Zustande schneller zerlegt; jedoch gibt es davon theoretisch sehr interessante Ausnahmen (s. u.).

Ebenso liegt — auch am isolirten Ester — die Bevorzugung eines der opt. Antipoden nicht ein für allemal fest. Es findet sich häufig die — unten näher zu erörternde — Substratinversion derart, daß etwa in verdünnter Lösung die (—), in konzentrirter die (+)-Form bevorzugt wird, so daß bei einer bestimmten Konz. beide Antipoden gleich schnell gespalten werden (Inversionskonzentration). Dadurch sind ohne Weiteres einige der häufig angegebenen Fälle von symmetrischer Spaltung zu erklären, da die entspr. Konzz. mit dem Substrat und dem angewendeten Enzym wechseln. Daneben scheint es aber Ester zu geben, die nur symmetrisch verseift werden, wahrscheinlich weil hier die Eigenschaften der beiden Ferment-Ester-Verbindungen (s. u.) keine sichtlichen Unterschiede aufweisen. Z. B. sollen nach **215)** die Ester substituirter Essigsäuren (Methyl-äthyl-essigsäure etc.) nur symmetrisch gespalten werden.

Auch bei der Synthese von Estern finden sich analoge Unterschiede in der Geschwindigkeit bei optisch verschiedenen Formen, wir werden darauf § 270 zurückkommen. Die systematische Erforschung dieses Gebietes wurde insbesondere von WILLSTÄTTER **216—221)** und P. RONA **222—229)** mit ihren Schülern ins Werk gesetzt. Während RONA sich besonders für die Aufklärung der Reaktionskinetik einsetzte, verfolgte WILLSTÄTTER auch die Vergleichung verschiedener Lipasen in dem Sinne, über deren essentielle Verschiedenheit als System, resp. die Grenzen ihrer relativen Spezifität ins Klare zu kommen. Die ersten Arbeiten sind bereits im H.W. referirt, insbesondere von R. KUHN (Allg. T. § 131). Später sind alle diese Fragen im Zusammenhang einerseits von BAMANN, andererseits von RONA und von AMMON weiter behandelt worden und haben große Bedeutung für die Probleme der Enzymwirkung überhaupt erlangt; diese Arbeiten werden am gegebenen Ort citirt werden.

---

*) Ich verwende hier meist die allein wirklich ausreichende Schreibform nach WOHL-FREUDENBERG, die sowohl die wahre Konfiguration (d resp. l) angibt, wie die effektive Drehung (+) = rechts, (—) = links; in den Originalarbeiten steht zuerst noch die Angabe der Drehung allein mit d oder l: d-Mandelsäure ist also hier = l (+), l-Mandelsäure = d (—); später ist dafür auch die an sich unmißverständliche einfache Bezeichnung (—) oder (+) zu finden, die aber wieder die Zusammenhänge nicht klarstellt. Wo es darauf nicht ankommt, werde ich sie auch benutzen.

215). ***R. Dawson, B. S. Platt, J. B. Cohen,*** Hydrol. of asymm. esters by lip. Biochem. Jl. **20**, 533 (1926). — 216) ***R. Willstätter, Fr. Memmen,*** Vergleich von Leberesterase mit Pankr. Lip. Zs. phys. Chem. **138**, 216 (1924). — 217) ***R. Willstätter c. s.,*** Zur Spez. der Lip. Zs. phys. Chem. **140**, 203 (1924). — 218) ***R. Willstätter, H. Kumagawa,*** Taka-Esterase, Zs. phys. Chem. **146**, 151 (1925). — 219) ***R. Willstätter, E. Bamann c. s.,*** Über die Konfig. Specif. der Esterasen in verschied. Reinheitsgraden. Zs. phys. Chem. **173**, 155 (1928). — 221) ***R. Willstätter, R. Kuhn, E. Bamann,*** Über asymmetrische Esterhydrolyse durch Enzyme. Ber. Chem. Ges. **61**, 886 (1928).

WILLSTÄTTER c. s. 216) haben zunächst eine Reihe von Estern der beiden Mandelsäuren, sowohl im Racemat, wie an den isolirten optischen Antipoden vergleichend gegen die Lipasen des Pankreas und der Leber untersucht. (Vgl. Tabelle H.W., § 131). Sie fanden z. B. bei L. aus Schweinepankreas eine Bevorzugung der d (—)-Form in beiden Fällen, im Gegensatz zur Leberlipase ist also hier die L. des Pankreas „rechtsorientirt". Hier treten also Unterschiede in der relativen Hydrolysen-Geschwindigkeit hervor, die bei beiden Enzymen nicht parallel laufen; sie können sogar bei ähnlichen Substraten z. T. parallel, z. T. gegen einander laufen. Die Magenlipase, sonst in der Allgemeinwirkung der Pankreasl. nahestehend (216, 217), verhält sich gegen die optisch aktiven Ester wie die Leberl.; ebenso die Taka-Esterase von *Aspergillus oryzae* (218)). Andererseits zeigte RONA 222) daß sich auch die gleichen Organlipasen verschiedener Tiere verschieden verhalten (s. u.).

Weiter zeigte es sich (219), daß diese Verschiedenheiten mit der Entfernung von Begleitstoffen nicht verschwinden; in keinem einzigen Falle konnte mit zunehmender Reinigung eine Verminderung der optischen Aktivität der Spaltprodukte, also der selektiven Spaltung eines der Antipoden beobachtet werden; bei Magenlipase (Schwein) sogar eine Verstärkung dieser Vorliebe. Es liegen also diese Auswahlerscheinungen im System der verschiedenen Organlipasen selbst; dies gilt auch für die so viel schwerer zu reinigende Leberlipase (BAMANN 237)).

Es muss nur dabei, um Fehlvorstellungen zu vermeiden, immer wieder definirt werden, was man unter „System" zu verstehen hat. WILLSTÄTTER hat zunächst nur so definirt, daß er völlig nebensächliche Ballaststoffe von der Definition ausschloß, und dann noch das engste Enzym an sich (Symplex gleich Wirkgruppe mit zugehörigem Träger) und „Begleitstoffe" unterschied. Diese sind nun z. T. noch solche, die die verschiedenen Lipasen zukommenden, vom Reinigungsgrad praktisch unabhängigen Eigenschaften bedingen; sie gehören also noch zum „System" des Fermentes im weiteren Sinne. Dieser Gedanke wird ja nun von KRAUT (l. c. 23) weitergeführt dahingehend, daß diese engeren Begleitstoffe nicht zufällig sind, sondern das Pheron selbst, nur in überschüssiger Menge. Ein anderer der Masse nach viel größerer Teil der Begleitstoffe aber gehört nicht zum engeren System; es sind die das Milieu ausmachenden accessorischen Begleitstoffe, die „Schlepper" des Enzyms (WILLSTÄTTER).

So also ist die Ansicht WILLSTÄTTERS zu interpretiren, daß die Wirkung von Giften zum Hauptteil durch die accessorischen Begleitstoffe bedingt ist, während die Konfigurationsspezifität und wieder ihre Beeinflussung durch Manipulationen am Enzympräparat, durch Lagern, Autolyse, Gifte (s. u.), umgekehrt auf die Begleitstoffe des engeren Systems zu beziehen ist. Wird dieses verändert, so kann sich auch die Konfigur.-Spezif. ändern, wie wir genauer schildern werden; im einfachsten Fall kann sie sich z. B. vermindern, wie es AMMON 231) beim Erhitzen von trockenem Pankreaspulver sah. Natürlich können andere Wirkungen auch durch das ganze weitere

---

222) ***P. Rona, R. Ammon,*** Ster. Spez. der Lip. Biochem. Zs. **181**, 49 (1926). — 223) ***P. Rona, R. Itelsohn-Schlechter,*** Ster. Spez. d. Lip. Biochem. Zs. **197**, 482 (1928). — 224) ***P. Rona, R. Itelsohn-Schlechter,*** Spalt. des Milchs.-Aethylesters etc. Biochem. Zs. **208**, 293 (1928). — 225) ***H. H. Weber, R. Ammon,*** Die stereochem. Spezif. von Leber- und Pankreaslip. Biochem. Zs. **204**, 197 (1929) S.A. — 226) ***P. Rona, R. Ammon,*** Assymm. Esterifiz. ebd. **217**, 34 (1930). — 227) ***P. Rona, R. Ammon, M. Werner,*** Ster. Spez. v. Taka-Est. ebd. **217**, 42 (1930). — 228) ***P. Rona, H. Fischgold, R. Ammon.*** Kinet. Betr. Ster. Spez. ebd. **228**, 77 (1931). — 229) ***P. Rona, R. Ammon, H. A. Voelker,*** Ferm. Mandelsäurebildung. ebd. **231**, 59 (1931).

System bedingt sein, dann ändern sie sich eben mit den einfachen Reinigungsprozessen, die ja dem Ziele zustreben, das für die spezifische Wirkung ganz entbehrliche Nebenmaterial wegzuschaffen. Dafür können wir überall Beispiele finden, so bei den Giftwirkungen (§ 266a). Wir führen dies hier nur deswegen nochmals an, weil die Konfig.-Spez. diejenige Eigenschaft der einzelnen Fermentpräparate ist, die am festesten am Typus, d. h. dem System haftet, und durch keinen der üblichen Reinigungsvorgänge verändert wird, die nur den Ballast entfernen (WILLSTÄTTER c. s. 219)); s. a. BAMANN 236). Solche Bemühungen, die Definition, soweit dies heute schon möglich ist, klarzulegen, sind ungemein wichtig, weil sich immer wieder Diskussionen entspinnen, die bei wirklich scharfen Definitionen wohl garnicht entstehen könnten. So kommt die Frage nach der Zumessung bestimmter Enzymeigenschaften zum „Enzym selbst", oder zu den „Begleitstoffen" naturgemäß solange nicht zur Ruhe, ehe man nicht sicher sagen kann, was denn „Enzym" und was „Begleitstoffe" sind. Daß dies leider heute noch nicht mit voller Präzision möglich ist, braucht nicht betont zu werden, aber qualitativ wenigstens kann man doch schon etwas genaueres sagen und so die Diskussionen abkürzen.

So liegt es auch hier. WILLSTÄTTER hat, wie gesagt, grade die Konfig.-Spez. auf das „Enzym selbst" bezogen. Nun betonen WEBER und AMMON 225), daß dies zu anderen Auslassungen WILLSTÄTTERS nicht stimme. Denn die Konfig.-Spez. ist zu einem wesentlichen Teile Affinitätsverschiebung zugunsten des einen Antipoden; und die Affinität soll nun grade nach WILLSTÄTTER c.s. (l. c. 3) auf die „Begleitstoffe" zu beziehen sein. In Wirklichkeit hat aber WILLSTÄTTER nur diejenigen Begleitstoffe gemeint, die noch irgendwie zum System gehören, nicht aber die zufälligen Ballaststoffe, wie aus seinen späteren grundsätzlichen Ausführungen über die Zustände in den Enzymlösungen klar hervorgeht. Er hat nur betont, daß die Affinität nicht allein von der Wirkgruppe (Agon) ausgeht, sondern vom Symplex und den noch dazugehörigen Teilen der Begleitstoffe (Pheron). Innere Widersprüche sind also hier nicht vorhanden.

Es sind aber nicht nur die Lipasen nach den Organen spezifisch, sondern auch bei denselben Organen nach der **Tierart** verschieden. Dies haben zuerst RONA und AMMON **222, 223)** beobachtet. L. aus Menschenleber bevorzugt bei d, l-Methylmandelat die d (—)-Form, die von Rind und Schwein die l (+)-Form. WILLSTÄTTER **219)** fand analog, daß die Magenl. von Hund und Schwein sich verschieden verhalten. Erstere zerlegt von den Antipoden des Phenyl-chloressigesters die l (—)-Form, letztere die d (+)-Form schneller. Leberl. von *Cyprinus carpio* verhält sich gegen Aethylmandelat umgekehrt wie die der Schweineleber (KERNOT **232)**), sie spaltet den d(—)-Ester schneller.

RONA **224)** gibt an, daß der Milchsäureäthylester durch die Enzyme aus Leber und Pankreas des Schweines asymmetrisch (Bevorzugung von (—) verseift wird, durch diejenigen aus Pankreas, Leber, Milz und Niere des Kaninchens dagegen symmetrisch gespalten wird; MASUI **233)** hat dies bestätigt, auch Rinderpankreas spaltet symmetrisch, Schweineorgane und Ricinuslipase asymmetrisch.

Konfigurationsspezifität fand KERNOT **232)** außer (s.o.) beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) auch bei vielen anderen Tieren (Leber). Die meisten Tiere aller Klassen bevorzugen bei Milchsäure-Estern (+), einige (Plötze, Karpfen, Emu (*Dromaeus Novae Hollandiae*), Papagei (*Ara*

---

231) ***R. Ammon, E. Tabor,*** Menschenpankr.- u. Menschenleberest. Biochem. Zs. **267**, 26 (1933) S.A. — 232) ***J. C. Kernot, H. W. Hills***, Lip. aus verschied. Org. des Karpfens. Die Hydrolyse asymmetr. aliphat. Ester durch Lip. d. Leber des Karpfens. Zs. phys. Chem. **208**, 33, 39 (1932); **215**, 8 (1933) S.A. — 233) ***Sh. Masui.*** Wirk. der verschied. Esterasen auf d, l-Milchs.-Aethylester. Acta Schol. Med. Tokyo **13**, 339 (1931).

Ararauna), *Iguana*, und Meeraal (*Conger vulgaris*) spalten symmetrisch. Darml. von *Helix* bevorzugt (—) (KUNTARA l. c. 72).

Eine Änderung der Konfig. Spez. während der Entwicklung wurde bei Leberesterase (Mensch, Aethylmandelat) vom Foetus bis zum Erwachsenen von BAMANN **240)** nicht gefunden, ebenso war sie bei pathologischen Lebern nicht verändert **(244)**.

Racemate und isolirte aktive Ester. Eine theoretisch wichtige Beobachtung war die Tatsache, daß die Auswahl ganz anders sein kann, wenn man die Lipasen vergleichend einerseits auf die racemischen Ester wirken läßt, andererseits auf die rein dargestellten einzelnen optisch aktiven Formen. Während nach **(216)** bei L. aus Schweinepankreas sich Racemate und isolirte optisch-aktive Mandelsäureester gleich verhalten, ist dies bei Leberlipase anders.

RONA c. s. **222, 223)** zeigten zunächst bei Methyl-mandelat, dann beim Aethylester, daß Leberl. (Schwein) aus dem Racemat die l(+)-Form vorzieht, bei reinen Estern aber die d(—)-Form, die um 40 % schneller gespalten wird als die (+) und die d, l-Form.

WILLSTÄTTER, KUHN und BAMANN **221)** bestätigten diese Tatsache, und gaben die — schon von RONA **222)** als möglich angedeutete — Erklärung dafür, ebenso WEBER und AMMON **225)** (Näh. s. l. c. 214). Nur bei relativ hoher Konzentration der beiden Ester, einzeln untersucht, wird der (—)-Ester schneller angegriffen, in verdünnten Lösungen der (+)-Ester wie im Racemat. Aus den p_s-Aktivitäts-Kurven folgt: der (+)-Ester hat beim Methylmandelat eine siebenmal so große **Affinität zur Lipase (225)** der (—)-Ester dagegen eine um etwa 50 % größere **Hydrolysengeschwindigkeit** der einmal gebildeten Ferment-Substratverbindung. Beim Aethyl-mandelat ist die Affinität zu (+) 3,2 mal größer **(221)**. Beide Größen sind aber von einander unabhängig. Spielt also (beim reinen (—)-Ester in hoher Konzentration) die relative Affinität keine Rolle, so wird er schneller gespalten; ist aber eine Konkurrenz zwischen den Affinitäten der (+)- und (—)-Form gegeben, wie im Racemat, so siegt die viel stärkere Affinität über die um weniger stärkere Hydrolysen-Geschwindigkeit, und es wird der (+)-Ester bevorzugt. Beim Pankreasenzym hingegen ist die Affinität zu (+) und (—) gleich groß, nur die Zerfallsgeschwindigkeit verschieden (1 : 1,7); der (—)-Ester zerfällt also fast doppelt so schnell, gleichgiltig ob im Racemat oder isolirt.

Analoge Untersuchungen wurden dann von der RONAschen Schule und von BAMANN **234)** an Enzymen verschiedener tierischer Herkunft angestellt, auf die wir noch zurückkommen. Bei der Taka-Esterase fanden RONA c. s. **227)** wiederum eine erheblich stärkere Affinität zum (+)-Ester als zum (—) (5 : 1), und eine Verschiedenheit der Hydrolysen-Geschwindigkeit zu gunsten der (—)-Form von 2 : 1.

Es sei noch erwähnt, daß nach BAMANN (§ 268) die § 266 erwähnte Hemmung durch Ketonsäure-Ester, Lactone etc. auf ganz analogen Ursachen beruht. Die Leberesterase hat zum Methylester der Benzoylameisensäure (Phenylglyoxylsäure) eine außerordentlich hohe Affinität, 5000fach größer als zum Mandelester (l. c. 190), und diese Verbindung zerfällt sehr langsam. Erst nach ihrem Zerfall tritt dann die Hydrolyse des Mandelesters mit normaler Geschwindigkeit ein. Mit diesen Befunden ist die theoretische Brücke geschlagen zwischen den Phänomenen der Konfigurationsspezifität und den strukturell bedingten Hemmungserscheinungen (§ 266).

Beeinflussung durch mit dem Enzymsystem reagirende Fremdstoffe. Die beiden Verbindungen des (+)- und (—)-Esters mit dem Enzym können durch Zusätze derartig beeinflußt werden, daß sich die relativen Spaltungsgeschwindigkeiten verändern; es

bilden sich dann wieder Ferment-Gift-Verbindungen mit neuen Eigenschaften aus. Solche Beeinflussungen hat man zuerst mit optisch-aktiven Zusätzen festgestellt; es können aber nach dem eben gesagten auch inaktive Stoffe wirken, und tun es auch, denn wenn zu den beiden diastereomeren Enzym-Substrat-Verbindungen ein dritter Stoff hinzutritt, so entstehen jedenfalls optisch-aktive Stoffe, ob der neu hinzutretende Stoff selbst aktiv ist oder nicht. Man kann da garnichts vorhersagen, es hängt eben alles von den Eigenschaften der neuen Komplexe ab. So fanden RONA und AMMON 222) Chinin unwirksam auf die optische Auswahl, ebenso ist Cocain wirkungslos (243). Dagegen fanden BAMANN c. s. 236, 237) mit Strychnin in sehr kleinen Mengen freier Base bei racemischem Mandelat und L. aus Menschenleber bei geeigneter Konz. (0,50 %) eine Umkehr in dem Sinne, daß nun der (—)-Ester viel schneller gespalten wird (Mandelsäure von $[\alpha]_D = -72,2°$); aber schon das so nahe verwandte Brucin wirkt kaum noch nachweisbar in demselben Sinne. Es entsteht tatsächlich ein dissociabler Komplex zwischen Strychnin und Enzym, der bei Dialyse wieder zerfällt, so daß die ursprüngliche Konfigurations-Spezifität wieder hergestellt wird. FISCHGOLD und AMMON 243) bestätigen die Strychninwirkung an den isolirten opt. Antipoden und stellten fest, daß es sich hier nicht um Affinitätsbeeinflussungen handelt, sondern daß Strychnin nur die Hydrolysengeschwindigkeit des (—)-Esters um ca. 150 % erhöht, und zwar sowohl bei 0,5 % wie 3 % Substratkonz. Daß man nichts verallgemeinern kann, zeigt der Befund (245), daß L. aus Menschenpankreas nicht beeinflußt wird, andererseits ist L. aus Schweineleber fast nicht zu beeinflussen (BAMANN 236)).

Abb. 1.
Beeinflussung der Hydrolyse der beiden Methylmandelate durch Strychnin nach AMMON und FISCHGOLD 243).

Von optisch inaktiven Stoffen wirkt auf die optische Auswahl das Spaltprodukt Alkohol. Dieser Umstand ist mit zu berücksichtigen beim Vergleich und bei der Auswertung der bei verschiedenen Spaltungsgraden des Esters erhaltenen optisch aktiven Säure (E. BAMANN u. P. LAEVERENZ) 235), weil sich dadurch eventuell die „Substratinversion" verschiebt (s. u.).

---

234) ***E. Bamann,*** Über die Konfig. Spezif. der Leberesterase verschied. Tiere usw. Ber. Chem. Ges. **62,** 1538 (1929). — 235) ***E. Bamann, P. Laeverenz.*** Über den Einfluß der Spaltprodukte auf das opt. Auswählen einer Esterase. Ber. Chem. Ges. **64,** 897 (1931). — 236) ***E. Bamann c. s.,*** Über den Einfluß von optisch aktiven Fremdstoffen auf die Konfig.-Spezif. der Leberesterase verschied. Tiere. Ber. Chem. Ges. **63,** 394 (1930). 237) ***Dies.,*** Über den Einfluß von optisch aktiven Fremdstoffen auf die Konfig.-Spezif. der Leberesterase verschied. Reinheitsgrades. Zs. phys. Chem. **193,** 201 (1930). — 238) ***E. Bamann, P. Laeverenz.,*** Die Konfig.-Spezif. der Leberesterase usw. Ber. Chem. Ges. **63,** 2939. — 239) ***G. M. Schwab, E. Bamann, P. Laeverenz,*** Konfig.-Spezif. der Leberesterase. Zs. phys. Chem. **215,** 121 (1933) S.A. — 240) ***E. Bamann c. s.,*** Vergl. des opt. Ausw. der Leberesterase etc. Zs. phys. Chem. **215,** 142 (1933). — 241) ***E. Bamann, P. Laeverenz,*** Opt. Auswählen der Leberesterase im System der ausgleich. Aktiv. Zs. phys. Chem. **223,** 185 (1934).

Aber auch die Enzympräparate an sich, ohne Fremdstoffe, können nach BAMANN 238) ihre spezifische Auswahl ändern.

Wenn man aus Frischleber (Mensch, Kaninchen) nach Acetontrocknung einen Auszug herstellt und etwas reinigt, so spaltet der Auszug beide Mandelester etwa gleich schnell. Läßt man das Trockenpräparat bei 60—65° einige Tage stehen, so bevorzugt der Auszug den (+)-Ester, und läßt man die Leber vorher autolysiren, so bevorzugt das extrahirte Enzym den (—)-Ester (238).

Es sind dann außer den Mandelsäureestern eine Menge anderer mit analogen Ergebnissen geprüft worden, was hier im Einzelnen nicht angeführt werden kann.

Eine Tabelle bis 1930 von AMMON 242) sei hier gekürzt und ergänzt wiedergegeben, (ungefähr dieselbe l. c. 214). Von weiter abliegenden Estern hat DAWSON (l. c. 215) auch die Tartrate geprüft. Pankreasl. spaltet Diaethyl-l (—)-tartrat besser, Leberl. Diaethyl-d (+)-tartrat; von KERNOT (l. c. 232) bestritten, der bei Rind und Karpfen auch für Leberl. den l (—) Ester bevorzugt fand (wahrscheinlich verschiedene Substratkonz., s.u.).

Übersicht über die Spaltbarkeit der Ester, nach R. AMMON 1930 242), etwas ergänzt (s.a. l. c. 214). Drehung der rascher verseiften Komponente racemischer Gemische.

	Schwein			Hund Magen	Pferd Magen	Taka	Mensch Leber u. Pankr.	Rind Leber	Cavia Serum	Cyprinis Leben	Helix Darmsaft
	Pankr.	Leber	Magen								
Mandels. Methyl	—	+				+	—	+	—		—
do Aethyl	—	+	+	+	+	+				—	
do Amyl		+									
do Benzyl		+									
do Glycerid		+									
Milchsäure, Aethyl ...		+								+	—
Weinsäure, Diaethyl .	—							—		—	
Phenyl-methoxyessigsäure, Methyl	—	+				+					
Phenyl-aethoxyessigsäure, Aethyl		+									
Phenylchloressigsäure, Methyl .... (ebenso Brom)	—	—	+	—		—					
Phenylaminoessigsäure, Propyl	+	+									
Tropasäure, Methyl..	+	—				—					
Leucinpropylester	+	+									
Buttersäure, Sec. Butyl	—	—									

Substratinversion. Infolge des sich verschiebenden Einflusses von primärer Bindung durch Affinität und sekundär verschiedenem Zerfall ist weiterhin das optische Auswählen einiger Esterasen (Leberesterase des Menschen und des Kaninchens) abhängig von

242) ***R. Ammon***, Stereoch. Spez. der Ester. Fermentforsch. **11**, 459 (1930) S.A. — 243) ***R. Ammon, H. Fischgold***, Über die Wirkg. der Strychnins auf die Konfig.-Spezif. der Menschenleberesterase. Biochem. Zs. **234**, 54 (1931) S.A. — 244) ***R. Ammon, W. Geisler***, Ster. Spez. der Esterasen. Arch. Path. (VIRCHOW) **285**, 286 (1932). — 245) ***R. Ammon, E. Tabor***, Menschenpankr.- u. Menschenleberester. Biochem. Zs. **267**, 26 (1933) S.A. — 246) ***R. Ammon, W. Geisler***, Asymm. Spalt. homol. rac. Mandels.-Ester etc. Biochem. Zs. **249**, 470 (1932) S.A. — 247) ***H. Fischgold, R. Ammon***, Die Aktivitäts-ps-Kurve bei der fermentat. Racematspalt. Biochem. Zs. **246**, 463; **247**, 338 (1932) S.A. — 248) ***H. Fischgold, R. Ammon***, Gesetzmäß. der Ferm.-Substr.-Bind. Biochem. Zs. **247**, 338 (1932) S.A. — 249) ***R. Ammon***, Esterasen und Lipasen. Ang. Chemie **1934**, 447. S.A.

der Konzentration des racemischen Substrates (BAMANN c. s. **234, 235, 239**)) In konzentrierten Racematlösungen (4°/₀) bevorzugen diese Enzyme den (+)-Mandelsäureester, in weniger konzentrierten spalten sie die Antipoden gleich rasch, so daß die Hydrolyse unspezifisch verläuft, und in sehr verdünnten (0,25 %) Lösungen zerlegen sie den (—)-Mandelsäureester rascher. Bei Kaninchenleberl. geht der Umschlag noch schneller vor sich. Diese Erscheinung wurde von RONA c.s. 228) bestätigt und „Substratinversion" benannt, Näh. l. c. 214, S. 59; einige Angaben s. u.

Dies gilt auch für andere Ester der Mandelsäure, aber immer schwächer, und hört beim Butylester auf; die Konz., in der symmetrisch gespalten wird, sinkt von Methyl bis Butyl ab, schließlich wird nur noch (+) bevorzugt (AMMON **246**)); es hängt dies anscheinend mit der abnehmenden Löslichkeit in Wasser zusammen. Nur bei dem echt löslichen Anteil der Ester tritt die Konfig.-Spez. auf. Indessen zeigt sich die Erscheinung an sich auch beim Butylmandelat bei niederer Konz., nämlich die Abnahme der Bevorzugung von (+); nur ist die Drehung hier so groß, daß kein Umschlag nach (—) erfolgt (**271**) z.B. bei 0,12 mol. $[\alpha]_D = 24{,}4$; bei $0{,}012 = 10{,}06$.

Weiteres zur Reaktionskinetik s. FISCHGOLD und AMMON **247**; sie geben Gleichungen für die Aktivitäts-p_S-Kurve und die Hydrolysenkonstante des Racemats aus den betr. Gleichungen für (+) und (—) berechnet.

Auch diese quantitativen Beziehungen sind wieder bei den einzelnen Tieren verschieden, wie BAMANN **234**) zeigte. Bei Leberl. von Mensch, Hund, Schaf, Kaninchen wird die optimale Konz. des Substrates bei (—) Mandelester erreicht bei 0,024 mol., bei Pferd und Rind noch nicht bei 0,096; während für (+)-Ester auch beim Schaf bei 0,096 (dem Löslichkeitsmaximum) die optimale Konz. noch nicht erreicht ist. Für die Schafleberl. werden die Konstanten und Hydrolysekonstanten ähnlich der des Schweines gefunden; die L. von Mensch, Hund, Kaninchen haben eine größere Affinität zum (—)-Ester. Leberl. von *Cyprinus* (KERNOT, l.c. 232) spaltet zuerst schneller den d (—) Mandelester, dann schneller l (+), wieder im Gegensatz zur Leberl. vom Schwein.

Nach (**234**) ist diese Verschiebung z.B. bei L. aus Schweineleber nicht vorhanden, ebensowenig bei Menschenpankreas (**245**). Die Drehung der gewonnenen Mandelsäure ist bei Menschenleber (**234**) in gesättigter Esterlösung (4 %) $[\alpha]_D = +48°$, bei 0,25 % — 34°; bei Kaninchen + 53 und schon bei 0,5 % — 52. Genauere Verfolgung der Kurven (**239**), z.B. bei Menschenleber Umschlag von + zu — bei 0,75 zu 0,5 % Gesamtkonz. RONA c. s. **228**) konnten am Methylmandelat den Gang der Kurve mit abnehmender Substratkonzentration genauer festlegen. Sie ist ausschließlich abhängig von der Substratkonz., nicht vom Verhältnis Enzym zu Substrat.

Diese Abhängigkeit von der Substratkonz. hat beim d, l-Aethylmandelat insofern Grenzen, als nach BAMANN **234**) die Orientirung auch bestehen bleibt, wenn die Substratkonz. so weit abgesunken ist, daß eigentlich die Umkehrung erfolgen mußte. Dasselbe fanden RONA c. s. **228**), BAMANN c. s. **235**) zeigten, daß dies auf die Wirkung des Spaltproduktes Alkohol zurückzuführen ist, der das Enzym bei der „Rechtsorientirung" festhält, wohl durch Bildung einer Enzym-Spaltprodukt-Verbindung (s. o.).

Die Säure ist dagegen ohne Einfluß. Eine Ausnahme bildet L. aus der Leber des Mantelpavians (BAMANN **241**)); hier bewirkt (—) Mandelsäure Bevorzugung der (+)-Spaltung, (+)-Mandels. wirkt schwach im entgegensetzten Sinne. Die „Ausgleichsaktivatoren" wie Kalkseifen ändern die Konfig.-Spez. nicht, wohl aber Na-Oleat allein (BAMANN **241**)).

Mit der Theorie dieser eigenartigen Abhängigkeiten von der Substratkonz. hat man sich mehrfach beschäftigt; wir können hier darauf nicht näher eingehen (s. a. l. c. 214).

FISCHGOLD und AMMON **247, 248**) suchen nach einer prinzipiellen Erklärung und finden sie in der Anwendung der Adsorptionsgesetze, die nach den grundsätzlichen Erörterungen von HITCHCOCK (1926) und WEIDENHAGEN (1930) auch hier formal genau so

anwendbar sind wie die Affinitätsformeln nach dem Massengesetz. In konzentrirten Lösungen wird die R.-Geschw. überhaupt herabgesetzt durch Wasserverdrängung von den reagirenden Oberflächen. Gegen diese Verdrängung können nun die beiden diastereomeren Ferment-Substrat-Verbindungen verschieden empfindlich sein, so daß das Verhältnis beider Antipoden an der Adsorption auf der Enzymoberfläche sich verschieben kann, und bei bestimmten Substratkonzentrationen dadurch eben beide Antipoden mit wechselnder Geschwindigkeit zerlegt werden (s. a. AMMON **249**)).

Am umfassendsten ist die Theorie von SCHWAB, BAMANN c.s., **239**) über die Gesetze der Konfigurations-Spezifität. Die optische Spezifität kann durch Berücksichtigung und kinetische Behandlung der Einzelvorgänge dargestellt, und so können die damit im Zusammenhang stehenden Erscheinungen befriedigend erklärt werden. Bei der Lipase aus Menschenleber sind die Vorgänge weit komplizirter als bei der aus Schweineleber und bei Lip. anderer Herkunft. Wahrscheinlich sind bei der Menschenleber-Lipase die wirksamen Orte für die (+) und (—)-Bindung auf der Oberfläche des Katalysators verschieden. Als experimentell gesichert wird angenommen, daß das Enzym mit dem Substrat, besonders dem (—)-Ester, zwei verschiedene Zwischenverbindungen ES und $E(S)_2$, eingeht, die sich verschieden verhalten.

6) Reversion der Wirkung; Synthesen.

§ 270. Die Synthese der Ester aus den Komponenten ist an sich ein sichergestellter Vorgang, über den zum H.W. relativ wenig zu ergänzen ist. ARTOM **250**) hat nochmals in quantitativen Versuchen alle Möglichkeiten diskutirt, ob es sich um eine echte Reversion oder eine eigene „Synthease" handelt und kommt trotz einiger scheinbarer Gegengründe zu dem Schluß, daß nur ein einziges Enzym am Werke ist, und die abweichenden Beobachtungen durch sekundäre Umstände zu erklären sind.

Bei Glycerinextrakten aus getrocknetem Pankreas bildet sich nach 48 h ein Gleichgewicht aus, bei dem 66 % der angewandten Ölsäure gebunden sind (GIBERTON **251**)). GROEN **252**) fand das Gleichgewicht bei Buttersäure-Amylalkohol bei 18 %, Ölsäure-Amylalkohol 50 %, Glycerin-Ölsäure 34 % nach 6 Tagen, bei reinster Ölsäure mit Glycerin aber 61 %, ARTOM bei demselben System sogar 75 %. Auch RONA und AMMON **253**) fanden bei Pankreasl. (Schwein) und n-Butylbutyrat ein echtes Gleichgewicht. Nach 52 h betrug die vorhandene (gebildete resp. restlich vorhandene) Säuremenge in mg pro 2 ccm; 3,73 resp. 4,78 (Abb. 2).

Abb. 2.
Gleichgewicht von Hydrolyse und Synthese nach RONA und AMMON **253**).

Die Synthese war früher nur bei den eigentlichen Fettsäuren verfolgt worden; am besten verestert Buttersäure

250) ***C. Artom, S. di Frisco,*** Az. lipolit. . . . del succo pancr. Arch. di Fis. **24,** 24, 70 (1926); BPh **37,** 880, 883. — 251) ***A. Giberton,*** Synth. des graisses etc. C. R. **190,** 951 (1930). — 252) ***J. Groen,*** Synth. Wirk. von Ferm., bes. Pankreas und Darmlip. Ned. Tijdschr. Gen. **69,** (1) H. 10 (1925); S.A. Arch. néerland. Phys. **11,** 169 (1926); BPh **37,** 880. — 253) ***P. Rona, R. Ammon,*** Enzym. Ester-Hydrol. u. Synth. Biochem. Zs. **249,** 446 (1932) S.A.

(Pankreas) resp. Propionsäure (Leber). Auch hier zeigt sich die durchgehende Trennung des „Esterase" und „Lipase"-typus. Denn Leber synthetisirt fast ebensogut Essigsäure bis Buttersäure, kaum noch Palmitinsäure, während Pankreas die höheren Fettsäuren noch gut verestert (Rona und Mühlbock 254)). Veresterung von Cetylalkohol mit Buttersäure (l. c. 263), mit echten Fettsäuren in Aceton-Aether (l. c. 263) sowie Fabisch (l. c. 264).

Erweiterung auf andere Säuren: Milchsäure (Rona, l. c. 226), Mandelsäure (Rona c. s. 257)) (l. c. 268) *). Andere Alkohole s. u.

Cholesterol wird durch Unterhautzellgewebe (255), sowie Pankreasenzym, nicht Leber und Darm verestert (256); Ergosterin und Phytosterin sind nicht zu verestern (255).

Methodischer Fortschritt: Zusatz von Aethylaether oder Aceton als Verdünnungsmittel, Sym 262).

Die Ester-Synthese ist in ihrer Geschwindigkeit ebenso wie die Hydrolyse weitgehend abhängig von allerlei Feinheiten der Struktur der Komponenten: Verzweigung der C-Kette, Stellung der Substituenten etc., sowie von der optischen Stereoisomerie (s. u.)

Aus der Arbeit von Rona und Mühlbock 254) seien einige Einzelheiten angegeben, zunächst für die Alkohole.

Pankreaslipase: Essigsäure, Isoamyl 82 %, n-Butyl 60 %, Isobutyl 51 %, Sec. Butyl 14 %, tert. Amyl 10 %, Benzyl 9 %, Phenylaethyl 19 %, Propyl 14 %, Methyl, Aethyl 6—8 %. Die niederen Glieder zerstören das Enzym, dagegen zeigt sich eine einfache Herabsetzung ohne Fermentschädigung bei den verzweigten Ketten.

Säuren: Isoamylalkohol wie erwähnt am besten Buttersäure, dann die eigentl. Fettsäuren, Essigsäure schwach. Verzweigte Ketten wirken stärker herabsetzend als bei Alkoholen. Isobuttersäure nur 1/9 der normalen; ebenso bei den Oxysäuren. (Oxybutters. 63 %, Oxyisobutters. 10 %) Halogen setzt nur in α-Stellung stark herab, β-Chlorpropionsäure kaum beeinträchtigt; bei Oxygruppe Stellung ohne Belang, verzögert in jedem Falle stark. Phenyl in α-hindert fast total, in β kaum. — Hier tritt wieder die Hemmung durch starke Affinität bei sehr geringer Hydrolysegeschwindigkeit hervor (§ 268). Phenylessigsäure hemmt die Veresterung Essigsäure-Isoamyl, und zwar umgekehrt proportional der Substratkonz., was bezeichnend für Affinitätshemmung ist.

Leberlipase: nur niedere Säuren; Esterasetypus, wie bereits erwähnt.

Alkohole: am besten Isobutyl 70 %, Isoamyl 66 %, sek. Butyl 48 %, Aethyl 6 %, tert. Amyl 10 %, also etwa ebenso wie bei Pankreasl.

Von sonstigen Strukturabhängigkeiten sei erwähnt: Veresterung von Glycin mit Alkohol möglich, mit Glycerin nicht (Wolff 258)).

Cis-Trans-Isomerie kann Einfluß haben. Fumarsäure (trans) doppelt so schnell wie Maleinsäure (cis). Dagegen so gut wie kein Einfluß bei den eigtl. ungesättigten Fettsäuren (Eruca-Brassidinsäure, Oleinsäure-Elaidinsäure) (Fabisch 259)).

---

*) Die Angabe l. c. 268 (S. 60) daß die erste Veresterung von Mandelsäure l. c. 254 erfolgt sei, scheint auf einem Schreibfehler zu beruhen. In der genannten Arbeit (l. c. 254) steht nichts davon.

254) ***P. Rona, O. Mühlbock,*** Ferm. Ester-Synth. Biochem. Zs. **228**, 130 (1930). — 255) ***R. Schönheimer, D. Yuasa,*** Verfügt d. tier. Organism. über Pflanzensterin-Esterasen? Zs. phys. Chem. **180**, 19 (1929). — 256) ***T. Nomura,*** Cholesterinester-Synthese, Tohoku Jl. of exp. Med. **5**, 323 (1924); BPh **31**, 687. — 257) ***P. Rona, R. Ammon c. s.,*** Enzym. Bild. von Mandels.-Estern. Bioch. Zs. **247**, 100 (1932) S.A. — 258) ***W. Wolff, Lafrançaise,*** Act. de l'extrait pancr. sur le glycocolle etc. C. R. **196**, 221 (1933). — 259) ***W. Fabisch,*** Ferm. Verest. geometrisch-isomerer Säuren. Bioch. Zs. **234**, 84 (1931).

Abgeschlossen: 20. Mai 1935. Ber. Phys. 84, H. 7/8.

Die **Kinetik der Synthese** ist nicht ohne weiteres mit der bei der Hydrolyse zu vergleichen, da mit Ausnahme der Glyceridsynthese in Glycerolextrakten des Enzyms der Vorgang eine makroheterogene Katalyse am Organpulver ist, das mit den reinen Substraten (Alkohol + Säure) und ev. etwas Wasser geschüttelt wird (RONA c. s. **263**)). Wir können hier nur einiges andeuten. Die Synthese wächst innerhalb gewisser Grenzen mit der Fermentkonz. (**254**). Die Synthese erfolgt ebenfalls über Ferment-Substratverbindungen, wie aus der Konfigurations-Specifität hervorgeht (s. u.). Vergleich der Kinetik der Estersynthese an sich und der Säurekatalyse s. SYM **260—262**) und RONA **263**). Für Buttersäure findet sich bei Butanol mit ansteigender Säurekonz. ein Maximum, dann Abnahme (Schädigung des Enzyms); bei der indifferenten Ölsäure und Elaidins. steigt die Synthese kontinuirlich mit der Säurekonz. (**261, 263**). SYM weist insbesondere darauf hin, daß auch bei Gegenwart von Wasser die Reaktion in der Glycerin-Ölsäure-Phase stattfindet, indem das Enzym sich an der Grenzfläche des Systems anreichert, entweder nur durch Adsorption oder durch Membranbildung. Jedenfalls wird die anfangs gelöste Lipase an der Phasengrenzfläche abgesetzt, und wirkt in solcher Adsorption. Eine größere Menge Wasser ist notwendig, damit das Enzym quellen kann.

Auch FABISCH **264**) fand etwas Wasser günstig, die besten Zeiten ergab ein Gemisch Wasser zu Glycerin 1 : 7. Jedoch ist das Wasser wichtig nur für die Glycerid-Synthese. Er arbeitete mit Emulsionen von Säure und Alkohol, als Emulgatoren Na-Oleat oder Desoxycholat. (m/50 — m/100). Bei Cetylalkohol ging es am schnellsten mit Ölsäure, dann Palmitin-Stearinsäure, parallel der Emulgirbarkeit. Ein Teil der Reaktion findet auf der Oberfläche der Emulsionstropfen, ein Teil im Innern statt.

Eine Hemmung der Synthese kann erfolgen durch: Entmischung der Emulsion (Elektrolyte), Albuminhäute an den Ölkugeln, Adsorption des Enzyms an Cholesterol.

Abhängigkeit vom ph: die schon von HANRIOT 1901 gefundene Tatsache, daß die Synthese auch noch bei stark saurer Reaktion statthat, hat VIRTANEN **265**) exakt bestätigt. Die Spaltung hört bei < 5 auf, während die Synthese bei ph < 4 noch kräftig ist (Milchdrüsenlipase).

Ca^{++} wirkt hemmend (RONA **253**)), 5—10 mal stärker La^{3+} (FABISCH), Mg fördert (Mandels.-Butyl) (**265**).

Kapillaraktive Stoffe: Äther und Aceton (RONA **263**)), sowie niedere Alkohole hemmen (ebenso SYM); ebenso die gebildeten Ester. Man soll nur mit Konz. von 0,3 n arbeiten (SYM).

Chinin, Strychnin bei Buttersäure-Butanol ohne Einfluß (**253**), bei Mandelsäure-Butanol Strychnin schwach hemmend (**257**), Buttersäure-Isoamyl stark hemmend (10 mg %) (**268**).

Gallensaure Salze aktiviren auch die Synthese (GROEN **251**), GIBERTON **252**)); sie sollen sogar bis zu einem gewissen Grade die schädliche Wirkung des Wassers aus-

---

260) ***E. A. Sym***, The synthetic action of pancreatic lipase in the system: oleic acid-glycerol-water-dissolved lipase. Biochem. Jl. **24**, 1265 (1930). — 261) ***E. A. Sym***, Kinetik d. Esterasewirk. im Vergl. zur Säurekatalyse. Bioch. Zs. **230**, 19 (1931). — 262) ***E. A. Sym***, Esterase III, IV. Bioch. Zs. **258**, 304; **262**, 406 (1933) S.A. — 263) ***P. Rona, R. Ammon, H. Fischgold***, Zur Kinetik d. enzymat. Esterbildung. Ebenda **241**, 263, 460 (1931). — 264) ***W. Fabisch***, Ferm. Estersynth. in Emulsionen. Bioch. Zs. **259**, 420 (1933). — 265) ***A. I. Virtanen***, Spalt. u. Synth. d. Ester etc. Zs. phys. Chem. **137**, 1 (1924).

schalten. Desoxycholat aktivirt Cetylalkohol + Palmitins., nicht Amylalkohol (FABISCH). Auch bei Buttersäure-Butanol ohne Einfluß (253), ebenso Mandels.-Butanol (257). Cholesterol hemmt auch hier durch Adsorption des F. (FABISCH).

Synthese durch **Bakterienlipase** (*B. pyocyaneus* u. a.) v. D. WALLE 266). Ölsäure läßt sich mit höheren Alkoholen verestern, nicht mit Methyl, Benzyl, Glykol; auch nicht Essigsäure und Buttersäure mit Glycerin. Über die Synthesen durch echte Phyto-Lipasen s. § 279.

Asymmetrische Synthese *). Im Allgemeinen folgt die Synthese optisch-aktiver Komponenten denselben Regeln, wie sie für die Spaltung gelten (§ 269), d. h. es ist immer eine der Formen bevorzugt; auch der Mechanismus ist derselbe: einerseits verschiedene Affinität bei der Ausbildung der diastereomeren Ferment-Substrat-Verbindungen, andererseits verschiedene Bildungsgeschwindigkeit und Zerfallsgeschwindigkeit dieser optisch-aktiven Komplexe (263, 267). So fanden RONA und AMMON (l. c. 226) 267), daß l(+)-Milchsäure sich mit Amylalkohol schneller verestert, ebenso Isobuttersäure mit (—)-Butanol. Ebenso zeigen sich ausgesprochene Spezifitäten bei Derivaten des Phenylcarbinols (Methyl bis Butyl) bei der Veresterung mit Buttersäure, es wird wie bei der Spaltung die (+)-Form bevorzugt (RONA, CHAIN, AMMON 270)).

Eine seltsame Ausnahme bildet die Mandelsäure (268, 269). Aus beiden Mandelsäuren wurden z. B. mit Butanol durch 5 verschiedene Lipasen die Ester mit gleicher Geschwindigkeit aufgebaut. Auch durch optisch-aktive Zusätze (Strychnin), oder durch fördernde (Mg) oder hemmende Ionen (Ca) ließ sich keine Asymmetrie erzielen. Auch bei optisch-aktiven Alkoholen (Äthylphenylcarbinol) wird die Säure symmetrisch an die bevorzugte (+)-Form des Alkohols gebunden (269). Eine Erklärung dafür geben RONA und CHAIN 271). Wenn man die homologen Säuren der Mandelsäure prüft, so findet man eine steigende Bevorzugung einer aktiven Form, also einen Gang, so daß man rückwärts daraus schließen kann, daß diese Bevorzugung einer Form bei der Mandelsäure selbst erloschen ist. Analog liegt der Fall bei der ebenfalls symmetrisch veresternden, der Mandelsäure auch konfigurativ gleichen Phenyl-chloressigsäure $C_6H_5 \cdot CHCl \cdot COOH$. Es ist also die symmetrische Synthese dieser beiden Säuren sozusagen ein Nullpunkt, von der aus sich eine mit der Länge der Kette wachsende Konfigurationsspezifität entwickelt. Bei den homologen Mandelsäureestern wird steigend die (—)-Form bevorzugt.

Was nun die Art der Konfigurationsspecifität anlangt, so ist sie bei den Säuren anscheinend fast durchweg linksorientirt ohne Rücksicht auf die effektive Drehung.

In der Reihe Milchsäure, Chlorpropionsäure, α-Oxybuttersäure, β-Oxybuttersäure werden verestert: l (+)-Milchsäure, l (—) Chlorpropionsäure, und die l (—)-Oxybuttersäuren. In der Mandelsäurereihe wird bei Phenylmilchsäure die (—) Form bevorzugt, ebenso bei α-Oxy-

---

*) Siehe den Vortrag von A. Mc. KENZIE 266a)

266) ***N. van der Walle***, Über synthet. Wirk. bakter. Lip. Zbl. Bakt. (2) **70**, 369 (1927). — 266a) ***A. Mc. Kenzie***, Asymm. Synth. und ihre Entwickl. Ang. Chemie **1932**, 45. — 267) ***P. Rona, R. Ammon, M. Werner***, Asymmetr. Esterbild. u. Spaltung durch Schweinepankreas- u. Leberesterase. Bioch. Zs. **221**, 381 (1930). — 268) ***P. Rona, R. Ammon c. s.***, Ferment. Mandelsäure-Esterbildung. Bioch. Zs. **231**, 59 (1931). — 269) ***Dies.***, Die enzymatische Bildung von Mandelsäureestern. Ebenda **247**, 100 (1932). — 270) ***P. Rona, E. Chain, R. Ammon***, Enzymat. Esterbildung u. Esterspaltung. Ebenda **247**, 113 (1932). — 271) ***P. Rona, E. Chain***, Konfig. Spez. der estersynth. F. Bioch. Zs. **258**, 480 (1933).

γ-Phenyl-buttersäure (indirekt erschlossen aus der Bevorzugung der (+)-Form bei der Styrylglykolsäure, die sterisch der (—)-Form der α-Oxy- γ-Phenyl-buttersäure entspricht). Auch bei den optisch-aktiven Alkoholen zeigt sich eine bestimmte Neigung zur bevorzugten Veresterung einer Reihe, und zwar bei den Aethylcarbinolen der d-Reihe, die bei den höheren (+), aber bei den niedersten Gliedern (Methylaethylcarbinol) (—) ist. RONA und CHAIN 271) fanden nun hier tatsächlich bei Methyl-aethylcarbinol den synthetisch entstandenen Ester (—), bei allen höheren Gliedern steigend (+) (Propyl-aethyl + 0,54, Amyl-aethyl + 8,35). Es findet sich also wieder der „Gang" wie bei den Säuren.

Das Geschwindigkeitsverhältnis (+)/(—) ist bei höheren Gliedern am größten, nimmt ab, kann den Wert 1 unterschreiten, und so die Drehung negativ werden.

Auch bei Aethylphenylcarbinol wird die (+)-Form bevorzugt (269). Dieser allgemeinen Bevorzugung der (+)-Reihe entspricht, daß die (—)-Form der optisch aktiven Carbinole stark die Hydrolyse hemmt, fünfmal stärker als (+) (l. c. 105).

Die asymmetrische Ester-Synthese läßt sich auch im enzymfreien Modellversuch reproduziren (WEGLER 272)). d,l- -Phenyl-aethanol gibt mit Säuren bei Gegenwart von Brucin als Katalysator ein optisch-aktives Produkt, und auch die einzelnen Antipoden werden verschieden schnell verestert, und zwar in der gleichen Reihe alle konfigurativ zusammenhängenden im gleichen Sinne. In der Reihe methylirter sekundärer Alkohole wie Methyl-butyl-carbinol oder Methyl-benzyl-carbinol ist die entgegengesetzte Konfiguration (meist) bevorzugt. Auch die Erscheinung läßt sich reproduciren, daß sich racemische Gemische anders verhalten, als die einzelnen isolirten Antipoden (273) z. B. mit d,l-Säurechloriden (Acetyl-mandelsäurechlorid) und Alkoholen + Brucin. Im Gegensatz zum Enzym hängt die „Inversion" auch z. T. von der Katalysatorkonzentration (Brucin) ab.

---

272) ***R. Wegler***, Über die mit versch. R.G. erfolgende Veresterung der optischen Antipoden etc. Ann. Chem. Pharm. (Liebig) **498**, 62; **506**, 77 (1932/3). — 273) ***R. Wegler***, Asymm. Synthese. Ebenda **510**, 72 (1934).

II. VORKOMMEN UND BEDEUTUNG.

§ 271. Über die Probleme biologischen Zieles ist seit dem Erscheinen des H.W. abgesehen von einigen Spezialfragen relativ wenig gearbeitet worden, da die Hauptprobleme teils geklärt, teils noch ebenso ungeklärt sind wie damals. An der Mitwirkung der Organlipasen bei dem ersten Abbau der Fette in den Zellen ist kein Zweifel möglich: andererseits ist das theoretische Postulat, daß Lipasen auch bei der Synthese von Glyceriden etc. in den Zellen mitwirken, noch immer experimentell nicht genügend zu stützen. Beide Vorgänge, Spaltung von Estern wie Resynthese von Estern aus Fettsäuren und Alkoholen, haben durch neuere Erkenntnisse eine noch viel größere Bedeutung im Stoffwechsel erlangt, als man früher annahm: es handelt sich durchaus nicht nur um eine einmalige Resynthese der im Darm zerlegten Neutralfette in den Zellen, der dann ein einmaliger Abbau folgt. Ganz im Gegenteil finden solche Hydrolysen und Synthesen häufig auch intermediär statt. Wahrscheinlich verläuft der Hauptteil des Fettabbaus nicht direkt, sondern über Phosphatide, so daß von den Glyceriden ein Fettsäurerest hydrolytisch abgespalten wird, und eine Re-Synthese mit Cholinphosphorsäure erfolgen muß; weiterhin werden aus freien Fettsäuren Cholesterate gebildet und wieder zerlegt. Alle diese verwickelten Vorgänge können wir enzymatisch noch nicht verfolgen. Speziell von der Synthese unter biologischen Bedingungen wissen wir noch überaus wenig: mit Ausnahme der einmaligen Beobachtung SCHÖNHEIMERS (§ 270) sind eigentlich alle enzymatischen Synthesen unter ganz unphysiologischen Bedingungen durchgeführt; nur gewisse theoretische Voraussagen über die Art, wie sie biologisch verlaufen könnten, lassen sich auf Grund der Vorstellungen von SYM und FABISCH (§ 270) machen. Sie haben wenigstens die frühere absolute Unvereinbarkeit der in-vitro Synthese in konz. Lösungen unter Ausschluß von Wasser mit biologischen Postulaten weggeräumt, indem sie prinzipiell die Möglichkeit zeigten, daß die Synthesen auch in wässerigen Systemen an den Grenzflächen von Emulsionen vonstatten gehen können. Aber rein biologisch, etwa mit überlebendem Zellbrei, ist die Synthese noch nicht realisirt. So ist denn tatsächlich zu den mehr deskriptiven Angaben im H. W. wenig prinzipielles zu ergänzen. Es ist im Wesentlichen nur die überaus große Literatur über Einzelfragen zu berichten, deren positive Ergebnisse leider recht geringfügig sind.

1) Pankreaslipase.

Für die präparative Darstellung von Lipase ist der Drüsensaft gegenüber der Extraktion des getrockneten Organs selbst ganz in den Hintergrund getreten. Mit der aus Pankreassaft gewonnenen Lip. hat neuerdings ARTOM 1) Versuche angestellt.

Pankreaslip. ist ein einheitliches Enzym, eine Trennung etwa von „Lipase" und „Esterase" ist durch Hitzeinaktivirung vergeblich versucht worden (LO MONACO 2)); neuerdings gibt WOLVEKAMP 3) an, daß er eine Differenzirung erreicht habe: durch Einwirkung von Hitze, Alkali und Säure ging regelmäßig die Wirkung auf Äthylacetat schneller zurück als die auf Tributyrin. Solche Befunde sind natürlich für das Vorhanden-

1) ***C. Artom, S. di Frisco,*** Az. lipol. del succo pancr. Arch. di fis. **24**, 24, 70 (1926); BPh **37**, 881, 883. — 2) ***G. Lo Monaco,*** Sul probl. del'ident. d. lip. e esterasi. Boll. Soc. Ital. Biol. **5**, 447 (1930); BPh **58**, 374; Arch. internat. Pharm. **42**, 387 (1932); BPh **69**, 753. — 3) ***P. Wolvekamp, K. Griffioen,*** Lip. Wirk. des Pankreas. Zs. phys. Chem. **228**, 36 (1934).

sein zweier Enzyme mit verschiedenen Trägern nicht ausreichend, ebensowenig wie die von AMAKI 4), der die Atoxylwirkung an rohen Extrakten gemessen hat: hier soll Atoxyl die Lipase fördern, ebenso Chinin in kleinen Dosen. Über das Vorkommen ist insofern wenig zu berichten, als es längst feststeht, daß jedes Pankreas aller Tiere das Enzym führt, und daß das Sekret des Jecur der Wirbellosen dem Pankreas auch darin physiologisch äquivalent ist (H. W., § 205). Auch alle Fische haben ein Pankreas, wenn es auch nur bei den Selachiern ein deutlich abgeschlossenes Organ ist, bei den anderen in feine Stränge verteilt.

Nachweis von L. bei *Acanthias vulgaris* VONK **4a)**). Neuere Untersuchung der Lip. aus *Helix* durch KUNTARA 5). Diese L. ist im allgemeinen der Pankreaslip. ähnlich, hat aber einige Besonderheiten, z.B. einen opt. ph von 9,0. Auch die L. des Kropfsaftes resp. Darmsaftes ist der der Pankreasl. ähnlich (KUNTARA, GRAETZ 6)), ebenso die anderer Schnecken (*Limax, Arion*).

Bei Feten ist L. auch von jeher gefunden worden, bei menschlichen Feten fand sie TACHIBANA 7) vom 4. Monat ab.

Physiologische Anpassungen sind neuerdings kaum erörtert worden. Bei Fettschweinen fand BACH 8) die Wirkung 2—3 mal so groß als bei Magerschweinen (Spaltung und Synthese). Thyroxin-Injectionen vermindern die lipatische Wirkung **(8a)**.

Röntgenbestrahlung des isolirten Pankreas erhöhte den Lipasegehalt der Durchströmungsflüssigkeit **(9)**.

Über **pathologische Veränderungen** ist kaum etwas Sicheres bekannt. BALÓ **10)** gibt an, daß bei Schweinen und geleg. bei Menschen Pankreasnekrosen mit erhöhtem Lipasegehalt der Drüse einhergehen, der eine ursächliche Bedeutung haben soll. Eine Wirkungsverminderung bei Icterus, aufgefunden mit Duodenalsonde, liegt nach FIESSINGER **11)** nur am Mangel an Gallensalzen in der entnommenen Darmflüssigkeit, nicht am Fermentschwund. Stärkere Abnahme sah MICALE **12)** bei Gastritis, Verschwinden bei Pankreastumoren; Verminderung bei exp. Tbc. (*Cavia*) VIRTANEN (l. c. 168a).

Pankreaslipase, Fettverdauung, Fettresorption. Diese verwickelten Zusammenhänge sind nunmehr endlich aufgeklärt. Es handelt sich darum, daß bei bloßer Ableitung gar keine, bei Unterbindung nur eine allmähliche und partielle Störung der Fettverdauung und -Resorption eintritt, während bei schweren Erkrankungen oder Totalexstirpation unter Versagen dieser Prozesse die bekannten „Fettstühle" auftreten, wobei die Resorption schwerer gestört ist als die reine Hydrolyse.

Diese Verhältnisse sind neuerdings exakt von LICHT und WAGNER **13)** wieder studiert worden. Nach Exstirpation sank die Resorption von Fett fast oder ganz auf Null, schwere Störungen traten auch auf, wenn alle Ausführungsgänge unterbunden

---

4) ***J. Amaki,*** Identitätsfrage der Lip. und Esterase. Tohoku Jl. Exp. Med. 8, 146 (1926); BPh **40,** 285. — 4a) ***H. J. Vonk jr.,*** Verdau. bei den Fischen. Zs. vergl. Physiol. **5,** 445 (1927) S.A. — 5) ***W. Kuntara,*** Lip. aus d. Darmsaft von Helix. Zs. phys. Chem. **225,** 169 (1934) S.A. — 6) ***E. Graetz,*** Verdau.-Ferm. einheim. Pulmonaten. Zs. phys. Chem. **180,** 305. Zool. Jb. Allg. Zool. **46,** 375 (1929). — 7) ***T. Tachibana,*** Phys. Invest. of Fetus. Jap. Jl. Obstetr. **11,** 92 (1928); BPh **49,** 539. — 8) ***E. Bach, L. Lovas,*** Ester spalt. Wirk. der . . . Pankr. Präp. Biochem. Zs. **245,** 345 (1932). — 8a) ***G. Scoz,*** L'az. d. tiroxina sull'amilasi, lip. etc. Boll. Soc. Ital. Biol. **9,** 971 (1934) BPh **84,** 467. — 9) ***A. Bogajewski c. s.,*** Einfl. der Rö-Str. auf d. Ferm. Bild. etc. Ž. eksp. biol. **9,** 328 (russ.); BPh **46,** 18 (1928). 10) ***J. Baló,*** Entsteh. Urs. d. Pankr. Nekr. Beitr. path. An. (ZIEGLER) **92,** 14 (1933). 11) ***N. Fiessinger, E. Phocas,*** Pouv. lip. . . . du suc pancr., Paris Méd. **1933,** I, 436; BPh **57,** 292. — 12) ***R. Micale,*** Esterasi del secr. ent. Boll. Soc. Ital. Biol. **5,** 240 (1930); BPh **57,** 325. — 13) ***H. Licht, A. Wagner,*** Gibt es ein die Fettres. förd. inneres Sekret des Pankreas? Klin. Ws. **1927,** 1982.

oder operativ entfernt wurden, so daß noch ein Stück des Drüsenkopfes zurückblieb. Auch Lombroso 14), 15) hat wieder diese Störungen beschrieben, findet sie aber immerhin geringer als bei Totalexstirpationen, selbst wenn man das ganze Duodenum entfernt. Nach Nothmann 16) wird bei pankreopriven Hunden im Dünndarm kein Fett gespalten, erst im Dickdarm durch Bakterien, wo es aber nicht mehr resorbiert wird. Es ist nun eben die alte Streitfrage, ob diese Störungen nur auf dem Ausfall der äußeren Sekretion, also auf Enzymmangel bei der Verdauung beruhen, oder ob noch ein besonderer Faktor der inneren Sekretion des Pankreas dabei bedeutungsvoll ist. Lombroso (*l. c. 142a*), der sich seit langer Zeit mit diesen Problemen beschäftigt, hatte zunächst diese Meinung vertreten; nachdem er nun aber in neueren Arbeiten (**14, 15**) bei diesen Störungen Insulin völlig unwirksam befunden hat, wie das auch Licht und Wagner sowohl bei experimentellen Schädigungen wie bei Erkrankungen des Pankreas fanden, so darf man wohl annehmen, daß tatsächlich das Pankreas als endokrines System mit diesen Ausfallserscheinungen seitens der Resorption nichts zu tun hat, wie dies Nothmann bereits klar formuliert hat, dessen pankreaslose Hunde freie Ölsäure, wenn auch nicht ganz normal, resorbierten (**16**).

Den Schwerpunkt dieser Wirkung des Pankreas verlegt Lombroso nunmehr auf die sonderbare Kombination von Lipasewirkung und oxydativem Fettabbau, die man als Lipodihäresis bezeichnet (s. u.), also in eine Stoffwechselwirkung: dabei soll das Inselhormon unentbehrlich sein. Es neigt sich also schließlich die Waage dahin, daß es tatsächlich nur die Verminderung der Fettspaltung ist, welche die Resorption derart verschlechtert.

Dann müsste aber der pankreoprive Hund freie Fettsäuren gut resorbiren. Aber auch dies ist nicht der Fall. Nach Nothmann 16) ist zwar eine verschieden starke, aber immer vorhandene Verminderung der Resorption von eingegebener Ölsäure (10—30 %) vorhanden. N. erklärt dies derart, daß beim Ausfall der Verdauung die Ölsäure mechanisch die unverdauliche Nahrung durchtränkt und mit ihr ausgeschieden wird.

Jedenfalls hat also das Pankreas als endokrines Organ mit diesen Vorgängen nichts zu tun; es bleibt nur noch seine Rolle in den seltsamen Prozessen der Lipodihärese.

§ 271a. Lipodihärese. Idee und Wort — das eigentlich „Verteilung" des Fettes bedeutet, — gehen auf Roger und Binet 17) zurück, wie wir schon im H. W. Seite 497 berichtet haben. Ausgehend davon, daß die Lunge das erste große Organ ist, welches die Fette nach ihrer Resorption vom Darm her passieren müssen (Ductus thoracicus — Vena subclavia sinistra — rechtes Herz), prüften sie, was mit den Fettstoffen (echte Fette und Lipoide) dort geschieht. Sie fanden eine Festhaltung des Fettes (Lipopexie) und einen Abbau des Fettes (Lipodihärese). Die erste experimentelle Grundlage der ganzen Theorie war der ständige Befund einer Differenz im „Fett"-Gehalt des Blutes vor und hinter der Lunge.

Auf dem Wege vom rechten Herzen zur Carotis verliert ein Liter Blut 670 mg „Fett", ähnliche Unterschiede zeigt jegliches venöses und arterielles Blut. Daß Fett tatsächlich in den Lungen

---

14) ***U. Lombroso,*** Sur le metabol. des graisses. Arch. internat. Phys. **28,** 261, 300 (1927); BPh **43,** 244. 557. — 15) ***U. Lombroso,*** Az. del secr. pancr. sull assorb. di ac. grassi etc. Boll. Soc. Ital. Biol. **3,** 295 (1928); BPh **47,** 587. — 16) ***M. Nothmann, H. Wendt,*** Hat das Pankreas . . . noch anderen Einfl. a. d. Resorpt. der Fette? Arch. exp. Path. **162,** 472, **164,** 266 (1932). — 17) ***H. Roger, L. Binet, J. Verne,*** Lipodiér. pulmon, (Zusammenf.). Jl. de Phys. path. **21,** 461 (1923).

festgehalten wird, ist auch anderweitig angegeben worden (Lit. bei BINET **18**)) und von BINET **19**) durch Einspritzen von Öl in die Carotis gezeigt worden, das mit Diphenyl-anthracen versetzt war; von allen Organen fluorescirt die Lunge am stärksten. ROGER, BINET c. s. **20**) fanden dasselbe bei den Kiemen von Fischen.

Diese Lipopexie in der Lunge ist aber gefolgt oder vorbedingt von einer Oxydation, denn bei Abschluß von Sauerstoff geht das Verschwinden von Fett in der Lunge nicht vor sich (H.W. S. 497). Die Weiterentwicklung dieses Problems ist dann etwas verschlungene Wege gegangen. Ursprünglich handelte es sich also nur um die Lunge. Sie sollte nach ROGER eine besondere Lipase produciren, eine Lipodihärase. Das hat sich aber nachher insofern geändert, als durch Eingreifen von LOMBROSO (l. c. 14, 15) **21**) und seiner Schule (**22—25**), sowie von NITZESCU **26/27**) diese Lipodihärese als ein allgemeiner Zellprozess aller Gewebe dargestellt wird, der unter absoluter Herrschaft des Pankreas stehen soll. Außerdem ist der oxydative Prozess auf Lecithin (GRIGAUT **27**)) und sogar auf Cholesterol (NITZESCU **29**)) übertragen worden. BINET hat sich (l. c. 18) dieser Ansicht angeschlossen, und stellt nur noch die Lunge neben der Leber als Hauptorgan des Angriffes der Fette hin.

Damit ist die ganze Sache eigentlich von dem Fermentproblem abgerückt, soweit es die Lipase anlangt. Es würde sich einfach um ein in diesem Werk nicht zu behandelndes Stoffwechselproblem handeln, wenn nicht der neue Gesichtspunkt dazugekommen wäre, daß die betr. Gewebe auch in vitro das Verschwinden von Fett bewirken. So ist es denn wenigstens bedingt doch ein Fermentproblem, das überleitet zu dem erst ganz neuerdings angeschnittenen Problem der spezifischen Dehydrasen der Fettsäuren, z. B. QUAGLIARIELLO **30**), auf das wir am geeigneten Orte zurückkommen werden. Hier wollen wir aus zwei Gründen eine ganz oberflächliche Übersicht geben: einmal, weil die Frage im H.W. bei den Lipasen nun einmal angeschnitten worden ist; und zweitens, weil es noch garnicht unbezweifelt feststeht, ob hier außer der selbstverständlichen Lipasewirkung überhaupt noch ein chemisch-zerlegender oder oxydativer Prozess stattfindet: es ist vorläufig noch garnicht zu übersehen, was hier eigentlich vor sich geht.

Vom Cholesterol wollen wir hier ganz absehen. Die Angaben über ein wirkliches oxydatives Verschwinden **29**) von Ch. sind ganz sicher falsch und anders zu deuten. Auch BINET (l. c. 18) zweifelt sie an; BUGNARD **31**) führt das Verschwinden in der Lunge auf einen — vom ph abhängigen — Übergang vom Plasma in die Körperchen zurück. Ebenso unwahrscheinlich ist die Vorstellung von LEITES **32**), daß die Lipodihärese von Fett in der Lunge auf einer Umwandlung von Fett in Cholesterol und umgekehrt bestehen soll; Cholesterol bildet sich sicher

---

18) ***L. Binet***, Fonct. internes du poumon, Traité de physiol. Paris 1933, Bd. V. S.A. — 19) ***L. Binet, R. Fabre***, Distrib. dans l'org. de l'huile etc. Soc. Biol. **99**, 190 (1928). — 20) ***H. Roger, L. Binet, J. Verne***, Lipodiér. . . . des vertebrés inf. Soc. Biol. **98**, 931 (1928). — 21) ***U. Lombroso***, Lipodieresi etc. Arch. di antropol. etc. **47**, 497, BPh **48**, 413. — 22) ***G. Ciaccio c. s.***, Comport. d. lipodier. del fegato etc. Boll. Soc. Ital. Biol. **1**, 146, 148 (1926) BPh **38**, 58. — 23) ***F. Gentile***, Metabol. des graisses. Arch. internat. Phys. **26**, 280 (1926); BPh **38**, 691. — 24) ***G. Sunzeri***, Metabol. des graisses. Arch. internat. Phys. **28**, 272 (1927); BPh **43**, 244. — 25) ***S. di Frisco***, Act. des extr. duodén. etc. sur la lipodiér. Arch. internat. Phys. **28**, 293 (1927); BPh **43**, 557. — 26) ***J. J. Nitzescu c. s.***, Lipodiér. pulm. Soc. Biol. **101**, 71, 74, 401 (1929). — 27) ***J. J. Nitzescu, Gr. Benetato***, Metabol. des lip. Bull. Soc. Chim. Biol. **12**, 827, 849, 864 (1930). — 28) ***A. Grigaut, R. Yovanovitch***, Lipogénese etc. Soc. Biol. **92**, 17 (1925). — 29) ***J. J. Nitzescu c. s.***, Cholesterinémie etc. Soc. Biol. **90**, 1067; **92**, 296 (1925). — 30) ***G. Quagliariello c. s.***, Pres. di una enz. deidrog. l'acido stearico. Rend. Acc. Lincei **16**, 387, 552; **17**, 476 (1932/3). — 31) ***L. Bugnard***, Régul. cholesterolémique et poumon. Bull. Soc. Chim. Biol. **12**, 97 (1930). — 32) ***S. Leites***, Rolle der Lungen im Fettstoffw. Biochem. Zs. **190**, 286 (1927).

nicht in Fett um; und andererseits ist die an sich sichere Neubildung von Ch. im Tierkörper in bezug auf die Vorstufen und den Mechanismus ein absolut unerforschtes Problem. Es kommen aber prinzipiell viel eher die Carotene als die Fette in Frage, weil bei diesen der „Isoprentypus" schon gegeben ist.

Wir wollen uns also auf eigentliche Fette und Phosphatide beschränken, denn das Hauptproblem, das Verschwinden von Fettsäuren, ist ja das gleiche. Hier ist nur wieder zu trennen das Verschwinden in vivo, z. B. bei der Durchströmung, und das des Abbaus durch Gewebebrei in vitro.

Abbau in vivo. Die Lipodihärese in der Lunge ist an sich mehrfach bestätigt worden, so von Grigaut (l. c. 28), von Sicard c. s. **33)** und von Nitzescu (l. c. 26, 27). Sicard c. s. zeigten z. B., daß nach Injektion jodirter Fette in die Trachea das Jod besonders schnell im Harn wiedererscheint.

Nitzescu fand im linken Herzen starke Abnahme der Fette, im rechten kaum. Auch das Lungenphänomen bleibt bei pankreopriven Tieren aus, kehrt unter Insulinwirkung zurück. Bei pankreopriven Tieren sind die Lungengefäße nach Verfütterung von Olivenöl noch nach 2 h mit Fett angefüllt, bei normalen nicht.

Binet c. s. **34—36)** haben in groß angelegten Versuchen mit Durchströmung von Lunge den Abbau niederer Fettsäuren gezeigt, und dabei RQ bis zu 0.64 herunter erhalten. Gerade das will nun freilich für das Hauptproblem, nämlich den Abbau höherer Fettsäuren, wenig besagen, denn gerade dieser Angriff durch die Kräfte der Zelle war bisher nicht nachzuweisen. Niedere, wasserlösliche Carbonsäuren werden ja überall angegriffen.

Gegenüber diesen positiven Befunden haben aber neuerdings eine Reihe von Forschern die gesamte Roger-Binetsche Theorie abgelehnt, weil sie diese experimentellen Grundlagen weder in vivo noch in vitro (s. u.) bestätigen konnten. Wahrscheinlich ist die ganze rätselhafte Erscheinung darauf zurückzuführen, daß überhaupt kein oxydatives Verschwinden der Fettsäuren stattfindet, sondern eine Maskierung, die sie dem direkten Nachweis entzieht (Schmitz c. s. **37)**).

Es sei also kurz folgendes erwähnt: Schmitz und Peiser **37)** fanden an β-Oxybuttersäure weder mit Lungenbrei noch bei Durchströmung irgend ein Anzeichen von β-Oxydation (in vitro sah auch Rordorf im Gegensatz zu anderen keine Oxydation; s. u.). Auch die eigentliche Grundlage, die „Lipopexie", das Festhalten von Fett in den Lungen, erkennbar z.B. an analytischen Unterschieden der Arteria und Vena pulmonalis, ist mehrfach glatt abgelehnt worden (Cantoni **39)**), Markowitz und Mann **40)**, Caccuri **41)**, Hoppe **42)**. Damit fällt auch das Phänomen der spezifischen Lipodihärese in den Lungen, das sich auf ein ganz allgemeines Verteilungsproblem zurückführen läßt, und tatsächlich tritt nun auch allmählich die Lunge ganz in den Hintergrund.

Das, was Binet u. a. an der Lunge gesehen haben, soll sich in allen Organen vollziehen, und in der Leber noch stärker als in der Lunge (Schule Lombroso, l. c. 21—25), Nitzescu, l. c. 26, 27). Auch Blut wirkt entsprechend, arterielles > venöses (Binet, Nitzescu).

---

33) ***J. A. Sicard, R. Fabre, G. Forestier***, Lipodiér. chez l'homme. Bull. Soc. Chim. Biol. **5**, 413 (1923). — 34) ***L. Binet, E. Aubel, M. Marquis***, Lipopexie et lipodiér. du poumon. Arch. Méd. chir. app. resp. **8**, 522 (1933) S.A. — 35) ***Dies.***, Action du poumon sur les acides gras etc. Soc. Biol. **109**, 2, 1169 (1932), **112**, 540 (1933) S.A. — 36) ***L. Binet, M. Marquis***, Perfusion du poumon. Presse Méd. **1934**. H. 7 S.A. — 37) ***E. Schmitz, F. Peiser***, Chem. Vorg. bei der Lipodiär. Biochem. Zs. **160**, 20 (1925). — 39) ***O. Cantoni***, Pretesa esist. d. lipodier. polm. Arch. di fis. **28**, 204 (1930). — 40) ***C. Markovitz, F. C. Mann***, Role of the lung in the metabol. Amer. Jl. Phys. **98**, 521 (1930). — 41) ***S. Caccuri***, Lipodier. polm. Rass. Ter. e. Pat. **3**, 29 (1931), Fis. e Med. **2**, 493; BPh **62**, 130; **64**, 103. — 42) ***G. Hoppe***, Fettstoffw. in der Lunge. Zs. exp. Med. **89**, 97 (1933) S.A. (weitere Lit.).

CIACCIO (l. c. 22) hat die Vorgänge besonders für die Leber verfolgt. Die Lipodihärese ist abhängig von der Ernährung, fehlt bei Hungertieren. Auch Einfuhr von HCl kann sie hervorrufen, sowie Injektion von Serum. Vergiftung mit Lebergiften (P, As, Alkohol), sowie B-Avitaminose bringen sie zum Schwinden. — Auch bei Tuberkulösen soll sie (Lunge) vermindert sein (**43**).

Die Hauptsache aber ist, daß überall auch für diese allgemeine Gewebswirkung in vivo die Mitwirkung des Pankreas als unentbehrlich bezeichnet wird; ebenso wenig wie die Lunge zeigt die Leber des pankreopriven Tieres die Lipodihärese (CIACCIO l. c. 22). Damit wird die Sache, wenn wir sie vom Fermentstandpunkt aus betrachten, im Sinne von NITZESCU auf ein allgemeines Gewebsenzym zurückgeführt, das mit Insulin als Aktivator arbeitet.

In der Tat wird von den Autoren behauptet, daß auch Gewebe in vitro eine lipodihäretische Wirkung haben, und zwar nicht nur Lunge und Leber, sondern auch andere Organe. Für Lunge gibt NITZESCU an, daß auf der Höhe der Verdauung bis zu 16 % Fett verschwinden. Für Leber werden ganz verschiedene Zahlen angegeben. Auch in vitro soll Lunge pankreopriver Tiere garnicht wirken, wohl aber wenn man ihnen Insulin injiciert; zugesetztes Insulin wirkt nicht. Methylenblau und fluorescierende Farbstoffe sollen die Lipodihärese fördern (**44**).

Was nun die L. der verschiedenen Organe anlangt, so haben sie zuerst ROGER und BINET **45**) mit Hilfe der Jodabspaltung aus jodirten Fetten bei Sauerstoffzutritt (vgl. SICARD l. c. 33) verfolgt. Sie finden die Reihenfolge Pankreas, Darm, Galle > Leber, Lunge > Niere, Muskel, Milz. — Muskel hat nach SUNZERI **46**) gar keine Lipodihärese, ebensowenig Unterhautgewebe (BINET **47**)). TEDESCO **48**) fand wirksam Nebenniere (Rinde und Mark), Hoden, Thyreoidea, Hypophyse (Hinterlappen); unwirksam Ovar, Thymus, Hypophyse (Vorderlappen).

Neben vielen anderen Unklarheiten ist noch besonders die Mitwirkung des Insulins unsicher. Es sei daran erinnert, daß REMESOW **49**) die fördernde Wirkung des Insulins auf Lipasewirkung in vivo damit erklärt, daß Insulin die inaktivirende Bindung an kolloides Cholesterol vermindert. Nun sollen auch hypertrophische Tonsillen ein insulinähnliches Agens enthalten, und ALAGNA **50**) behauptet, daß Extrakte solcher (nicht normaler!) Tonsillen die Lipodihärese von Leberbrei aktiviren.

Was nun hier in vitro vor sich geht, ist zunächst garnicht zu sagen. Eine endgiltige Klärung auch der einfachsten Grundlage, ob nämlich wirklich ein oxydativer Abbau erfolgt, steht aus. In exakten Versuchen (WARBURG-Methode) hat bei der Lunge, also dem Hauptobjekt neben Leber, RORDORF **51**) jegliche zusätzliche Sauerstoffzehrung vermißt. Ehe das nicht positiv oder negativ entschieden ist, muß man sehr zurückhaltend sein. Bisher ist ja tatsächlich niemals eine Fettoxydation im Zellbreiversuch nachweisbar gewesen; darauf kommen wir im Kapitel Zellatmung zurück. Auch bei den in vitro-Versuchen wird man zunächst eher an eine analytische Maskierung des Fettes durch Änderung der physikochemischen Verhältnisse denken müssen.

Bleiben also die in vivo-Versuche, die bisher ebenfalls kaum zu deuten sind. Daß

---

43) ***E. Bossan, P. Borin,*** Lipodiér. chez. les tuberc. Bull. Soc. Chim. Biol. **6**, 181 (1924). — 44) ***G. Sunzeri,*** Az. di alc. sost. fotodinam. s. lipodier. Boll. Soc. Ital. Biol. **7**, 740 (1932). — 45) ***H. Roger, L. Binet,*** Act. des divers tiss. sur les graisses. Soc. Biol. **96**, 377 (1927). — 46) ***G. Sunzeri,*** Lipodiér. dans le tissue musc. Arch. internat. Phys. **23**, 337; BPh **30**, 717 (1924). — 47) ***L. Binet, J. Verne,*** Destruct. des huiles etc. Soc. Biol. **93**, 421 (1925). — 48) ***P. A. Tedesco,*** Az. lipodier. d. ghiandole endocrine. Clin. Med. Ital. **56**, 28; BPh **32**, 799 (1925). — 49) ***J. Remesow,*** Blutlipase. Zs. exp. Med. **87**, 613 (1933) S.A. — 50) ***G. Alagna,*** Contr. allo studio d. tonsilla pal. Rass. ital. Oto-rinol. **2**, 3 (1928); BPh **45**, 634. — 51) ***R. Rordorf,*** Metabol. dei lip. nel polmone. Arch. di Sci. Biol. **20**, 113 (1934) S.A.

die Zellen irgendwie Fettsäuren oxydiren können, sei es direkt oder über zuckerähnliche Zwischenprodukte, ist selbstverständlich, aber experimentell nachzuweisen war es bisher nicht, und für echte Fettsäuren ist der Beweis auch durch diese Arbeiten nicht erbracht. Und die Rolle des Insulins macht die Sache noch rätselhafter, da wir über dessen Wirkung immer noch fast nichts wissen. Jedenfalls genügt es — von experimentellen Zweifeln ganz abgesehen — durchaus nicht, hier von einer „Lipodihärese" mit Insulin als Aktivator zu sprechen: vorläufig liegt hier noch ganz überwiegend ein reiner Stoffwechselvorgang zu grunde, den wir hier nicht zu behandeln haben. Soweit etwa dehydrirende Enzyme mitwirken, werden wir auf die ganze Sache bei den betr. Abschnitten zurückkommen.

2) Lipase des Darmsekretes.

§ 272. Lipase findet sich in allen Darmsekreten bis hinunter zum Dickdarm; der reine Dickdarmsaft enthält nach BICKEL **52)** keine L. mehr, sondern nur Amylase und Ereptase. Bei Feten (menschliche vom 3. Monat an (erneut nachgewiesen (**53**)).

Nach den eingehenden Untersuchungen an Darml. von Hunden mit THIRY-VELLA-Fistel von REALE **54)** ist das Enzym im Darmsaft nicht echt gelöst, sondern an noch ziemlich grobe morphotische Elemente gebunden, aus denen es allmählich — wohl durch autolytische Prozesse — herausdiffundirt. Es ist also ein Desmoenzym; dementsprechend ist auch sein Verhalten, das in der Mitte zwischen den Extremen Pankreas- und Leberlipase steht. Der ersteren ähnelt es nach MICALE **55)** in bezug auf Wirksamkeit (betonte Fettspaltung) und den opt. ph von 6,8; sowie die Aktivirbarkeit durch Gallensalze (HERZFELD **55a)**, PIERCE c.s. **55b)**); der Leberlipase durch viel stärkere Resistenz gegen Atoxyl und fast absolute gegen Chinin (REALE **54)**. Weitere Angaben über Thermoresistenz, ph, Kationenwirkung etc. bei den betr. §§; Wirkung auf verschiedene Ester **54)** (IV).

Ihre Menge im Nüchternsaft des Duodenums gibt SCHMIDT-OTT **56)** zu 0,6 L.E. im ccm an, bei Verdauung 0,9; jedoch sind nach THAYSEN **57)** die Werte bei normalen Menschen sehr schwankend, namentlich wenn (bei Hyperacidität) der Duodenalsaft sehr sauer ist. Gallensalze befördern die Sekretion, auf das Enzym selbst haben sie nur schwach aktivirende Wirkung (SCHMIDT-OTT).

Irgendwelche Regelmäßigkeiten der exact gemessenen L.E.-Werte bei Krankheiten konnte SCHMIDT-OTT **56)** nicht auffinden.

Fische: Bei *Perca fluviatilis* fand HYKES **57a)** eine L. im Darm; Temp.-Opt. 26°. Opt. ph = 6,64.

Wirbellose: Lipase im Darmkanal der Honigbiene (*Apis mellifica*) EVENIUS **58)**, im Darmsaft von *Helix* u.a. Schnecken GRAETZ und KUNTARA (l. c. 5, 6); weitere Angaben § 278, z. B. l. c. 306.

52) ***A. Bickel, H. R. Kanitz,*** Zusammens. des reinen Darmsaftes etc. Biochem. Zs. **270**, 378 (1934). — 53) ***T. Tachibana,*** Phys. Invest. of fetus, Lipase in intest. Jap. Jl. Obstetr. **11**, 227. BPh **51**, 483 (1929). — 54) ***L. Reale,*** Ester. del. secr. ent. I—IV. Boll. Soc. ital. Biol. **7**, 1380; **8**, 492, 1622 (1932/3), **9**, 793 (1934) BPh **84**, 591; Arch. farm. sper. **56**, 512 (1933) S.A. — 55) ***R. Micale,*** Esterasi del secr. enter. Boll. Soc. Ital. Biol. **5**, 240 (1930); BPh **57**, 325 — 55a) ***E. Herzfeld,*** Einf. Meth. zur Mess. von Lip.-Wirk. Mikrochem. **15**, 227 (1934). — 55b) ***H. B. Pierce c.s.,*** Enzymbild. im oberen Jejunum, Jl. of biol. Ch. **108**, 239. Ch. Cbl. 1935, I, 2550. — 56) ***A. Schmidt-Ott, K. Stauder,*** Best. der Fettspalt. im Duod. D. Arch. Klin. Med. **163**, 156 (1929); Arch. Verdau. **45**, 197; BPh **51**, 484. — 57) ***Th. E. H. Thaysen, A. Norgaard,*** [H+] u. Lipasegehalt d. Duodenalsaftes. Acta med. Scand. Suppl. Bd. **26**, 390 (1928); BPh **47**, 94. — 57a) ***O. V. Hykes,*** Ferm. des poissons. Soc. Biol. **117**, 166 (1934); BPh **83**, 527. — 58) ***J. Evenius,*** Ferm. im Darmkanal der Honigbiene. Arch. Bienenk. **7**, 229 (1926).

3) Lipase des Magens.

§ 273. Die Magenlipase ist in erster Linie ein Schleimhautferment, also ein Zellferment, und zwar, wie WILLSTÄTTER zeigte, ein an sich auffallend schwaches Ferment mit ganz besonderen Eigenschaften. Ob es im Magensaft, und somit bei der Fettverdauung eine nennenswerte Rolle spielt, ist immer noch unentschieden, wenn es auch im reinen Fistelsaft beim Hunde nachweisbar ist; denn auch hier ist es eigentlich ein an Zellen gebundenes Desmoenzym (s. u.). Seine Wirksamkeit hängt sehr von den Begleitstoffen ab, ist bei Rohpräparaten anders als bei den gereinigten u.s.w. Auf wechselnde Begleitstoffmengen sind wohl auch die von SLUYTER **59)** beobachteten Schwankungen der Wirksamkeit zu beziehen.

Das Schleimhautenzym ist bei menschlichen Feten im 4. Monat nachweisbar (TACHIBANA **60)**); beim Säugling ist es reichlicher vorhanden (WALTNER **61)**). Vergleichende Messungen der Magenlipase hat HAUROWITZ **62)** ausgeführt. Bei Wiederkäuern hat er sie vermißt; von Säugetieren führen am meisten Mensch, Hund, Katze und Nagetiere. SALVIETTI **63)** fand sie aber auch bei Rindern in allen Teilen des Magens.

Bei Vögeln fand HAUROWITZ nur geringe Mengen, bei Tauben garkeine; ph schwankt zwischen 7,9 und 8,6: Seetaucher (*Urivator arcticus*), Lachmöwe (*Larus ridens*), Gans, Truthahn (*Meleagris*), Fasan (*Phasianus*), Birkhuhn (*Tetrao*), Huhn, Bussard (*Buteo*), Gabelweihe (*Milvus*), Sperber (*Nisus*). Bei Fischen mit Magen findet sich dort auch L., wenn auch nur geringe Mengen. HAUROWITZ fand sie (ph = 8,6) bei Hecht (*Esox lucius*), Zander (*Lucioperca sandra*); ph = 7,1 — 7,9 beim Karpfen (*Cyprinus carpio*).

Sitz der Lipase beim Schwein. Nach den bisherigen Angaben ist die Cardia am reichsten. Nach GLICK **64)** ist aber beim Schwein die Produktion gleichmäßig über den Magen verteilt, Cardia produciert nicht besonders reichlich. Hauptproduktion Oberflächenepithel und Muscularis mucosae.

Rolle der Lipase: Gegen eine wesentliche Beteiligung an der Fettspaltung im Magen spricht bei vielen Tieren die Lage des optimalen ph des isolirten Fermentes, die bei normaler Acidität des Magensaftes kaum noch eine Wirkung übrig läßt, besonders wenn dieser optimale ph bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion liegt (s. o. und § 265). Dieser optimale ph ist für jede Tierart nach HAUROWITZ sehr konstant und — wie danach zu vermuten — unabhängig von jeglicher Art der Ernährung. Damit gelangen wir nun zu der alten Frage, ob die Magenlipase erstens überhaupt in den reinen Magensaft übergeht, und zweitens, wenn dies der Fall ist, ob sie ein echtes Drüsensekretionsprodukt ist, oder etwa nur aus der Schleimhaut selbst in geringer Menge übertritt. Fest steht nur, daß im reinen Fistelsaft des Hundes eine gewisse Menge Lipase zu finden ist. Sie wird hier aber auch nicht als echtes Drüsensekretionsprodukt, sondern durch Abgabe von Zellbestandteilen mit oder ohne Zellzerfall entstanden aufgefaßt **(65, 66)**. Das Sekret aus dem „kleinen Magen" nach PAWLOW enthält

---

59) ***E. Sluyter,*** Period. de la lip. de l'estomac. Arch. Néerl. Phys. **9**, 414 (1924); BPh **29**, 643. — 60) ***T. Tachibana,*** Phys. Inv. in fetus III. Jap. Jl. Obstetr. **11**, 20 (1928); BPh **47**, 94. — 61) ***K. Waltner,*** Ferm. des Säuglingsmagens. M.-S. Kindhlk. **32**, 37 (1927). — 62) ***F. Haurowitz, W. Petrou,*** ph.-Opt. der Magenlip. verschied. Tiere. Zs. phys. Chem. **144**, 68 (1925). — 63) ***M. Salvietti,*** Topogr. dei f. digest. nello stomaco dei bovini. Riv. di Biol. **14**, 64 (1933); BPh **69**, 511. — 64) ***D. Glick,*** Verteil. der Esterase in der Schleimh. von Magen etc. Zs. phys. Chem. **226**, 186 (1934). — 65) ***C. Constanzi, S. Antonucci,*** Az. del. secr. d. ghiand. chloridro-pept. Arch. di farm. **40**, 220 (1925). — 66) ***A. Clementi,*** Ric. sulla ... lipasi. Arch. di Fis. **21**, 471 (1924) S.A.; **23**, 279 (1925); BPh **36**, 421, Atti Acc. Med. Roma **50**, (1923/4) S.A.

nach CLEMENTI 66) und RASENKOW 67) keine L., wenn dafür gesorgt wird, daß es frei von Blut und Epithelien ist, und die an sich vorhandene Wirkung freier Salzsäure auf Tributyrin in Rechnung gestellt wird. Auch nach MELLI 68) gibt die unverletzte Schleimhaut keine L. ab. Die Pepsin-Salzsäure-Drüsen des Hundes produzieren danach keine Lipase. Ob unter diesen Umständen, etwa aus freiwillig zerfallenden Epithelien, eine nennenswerte Menge L. in den Mageninhalt abgegeben wird, ob ihr also eine wesentliche Rolle bei der Fettverdauung zugeschrieben werden kann, ist damit noch nicht entschieden, und die Frage noch offen. Außerdem könnten bei anderen Tieren die Verhältnisse anders sein; für den Menschen steht eine sehr umfängliche Diskussion vor einem unentschiedenen Ergebnis. Im menschlichen Magensaft ist nämlich der Nachweis einer autochthonen Lipase zum mindesten beim Erwachsenen nicht zu führen, wenn es nicht gelingt, den Einfluß des Rücktrittes von Duodenalsaft, also Pankreaslipase, in den Magen auszuschalten. Dies ist mehrfach versucht, aber ohne sicheren Erfolg (H.W., S. 488).

Eine neuere Untersuchung von MELLI **68)** soll aus den Aktivitäts-ph-Kurven ergeben, daß der Magensaft zwei Lipasen enthält, von denen also die eine die des Magens selbst wäre. TAKATA **69)** behauptet, daß Alkali die Magenl. zerstört, die zurückgeflossene Pankreasl. nicht, so daß er aus der Differenz zweier Bestimmungen vor und nach einer Alkalisirung die Magenl. zu bestimmen glaubt. Im Saft des speisefreien Magens kommen danach meist beide L. vor, manchmal nur Magenl., die bei Anacidität fehlt. Atropin öffnet den Pylorus und läßt Pankreassaft zurücktreten. Auch DELHOUGNE **70)** glaubt an die Zerstörung fremder Lipase durch Alkali und hält die menschliche Magenl. für ein normales Sekretionsprodukt.

Die **Lipasewirkung im Säuglingsmagen** wird bei Brustkindern dadurch verwickelt, daß hier zweifellos zwei Lipasen mitwirken, die echte L. des Magens selbst und die L. der Frauenmilch (DAVIDSOHN *l. c. 243*, BEHRENDT, *l. c. 244a*). Da die Milchl. ihr ph-Opt. bei etwa neutraler Reaktion hat, so kann sie nur im Anfang der Magenverdauung wirken, später bei zunehmender Acidität setzt dann die Magenl. selbst ein. LANDSBERGER **70a)** hat diese Angaben bestätigt und auch die Beobachtung DAVIDSOHNS, daß Tributyrin in Frauenmilchmolke durch die Säuglingslip. schneller gespalten wird als in Kuhmilchmolke, weil eben Kuhmilch keine aktive L. enthält. Diese Versuche wurden mit Tributyrin angestellt, da Frauenmilchlip. gegenüber den Milchfetten selbst inaktiv ist. Es gelang aber FREUDENBERG **71)**, diese inaktive L. durch eine „Kinase" zu aktiviren, worauf § 277 näher einzugehen sein wird. Jedenfalls also wird Frauenmilchlip. im Magen wirksam und erzeugt zunächst eine gewisse Acidität, die ganz vorwiegend — beim Neugeborenen — eben auf diese Lipolyse zurückzuführen ist, da freie HCl praktisch noch fehlt (SCHEMANN **72)**). Eben durch diese Acidität kommt die Labung der Frauenmilch in Gang (ph = 6,5; im Versuch durch entspr. Zusatz von HCl herzustellen) (FREUDENBERG), und dann die weitere Lipolyse durch die Magenlip. So ist hier eine zweckvolle Zusammenarbeit von Frauenmilchlip. und Magenlip. in der gesamten Magenverdauung junger Brustkinder hergestellt, die sich mit wechselndem ph verschieden einstellt; in allen Fällen wirken Eiweißabbauprodukte fördernd auf die Lipolyse **(73)**, bei saurer

---

67) ***J. P. Rasenkow***, Zur Frage über die Magenlip. Russ. Fis. Žl. **9**, 87 (1926); BPh **44**, 540. — 68) ***G. Melli, M. Radici***, Esiste una lipasi gastrica? Fol. clin. chim. microsc. **8**, 169 (1928); BPh **49**, 494. — 69) ***M. Takata***, Lipase im menschl. Magen. Zs. Klin. Med. **98**, 120 (1924). — 70) ***Fr. Delhougne***, Über die Magenlipase. D. Arch. Klin. Med. **152**, 166 (1926). — 70a) ***M. Landsberger***, Magenlipase. Zs. Kind. **39**, 665 (1925). — 71) ***E. Freudenberg***, Verdau.-Physiol. des Sauglings. Zs. Kind. **43**, 437; **46**, 170 (1927/8) S.A. — 72) ***E. Schemann***, Magenverd. beim Säugling. Zs. Kind. **46**, 210 (1928) S.A. — 73) ***H. Lichtenberg***, Magenlipase. Zs. Kind. **54**, 732 (1933) S.A.

Reaktion halten sie das Optimum für die Magenlipase fest, und zwar sind es peptische Produkte; andere fördern wieder mehr bei ph = 7 (Dipeptide, Aminosäuren). In jedem Falle aber ist hier nach FREUDENBERG die Milchlip. wichtiger als die spärliche Magenlip.

Bei ph = 3, also bei älteren Brustkindern, hört die Fettverdauung auf, da die Kinase zerstört wird (§ 277). Alle diese Beziehungen gelten aber zunächst nur für die an L. reiche Frauenmilch. Wie es beim Säugling mit Kuhmilch, wie es bei anderen säugenden Tieren steht, ist noch nicht völlig klar. Doch wird hier wohl der für eine Wirkung der Magenl. selbst notwendige ph auf irgend eine Weise auch schon bei ganz jungen Tieren erreicht werden: etwa durch eine wenn auch noch nicht voll ausgebildete HCl-Abscheidung; und ferner enthalten ja auch die anderen Milchen etwas Lipase, selbst wenn man von einer Bakterienwirkung ganz absehen will, die aber durchaus möglich ist, eben weil die starke Acidität des Magensaftes noch nicht vorliegt. Außerdem aber sind die Fette anders konstituiert, unterliegen leichter der Wirkung der Magenl. als die Fette der Frauenmilch. FREUDENBERG weist ausdrücklich darauf hin, daß Säuglingsmagen bei ph = 5 aus Frauenmilch nicht, wohl aber aus Kuhmilch niedere Fettsäuren abspaltet.

Gastrolipase bei Störungen der Magenfunktion. Bei Magenerkrankungen soll das Ferment vermindert sein, und zwar sowohl bei Hyperchylie, wie vor allem bei Achylie und Carcinom, wo es ganz fehlen kann (*l. c. 187*). Auch bei Anacidität fehlt es (TAKATA l. c. 69), bei zu hoher Acidität ist es gehemmt (DELHOUGNE l. c. 70), Auch SCHEMANN fand Verminderung der Lipolyse bei Magenerkrankungen, FREUDENBERG Verminderung oder Fehlen der Kinase bei Dyspepsien. Alkaloide haben bei parenteraler Zufuhr keinen Einfluß (DELHOUGNE). Die klinische Bedeutung etwaiger Veränderungen ist minimal.

4) Lipase des Blutes.

§ 274. Dieses Enzym gehört zu der Untergruppe der Lipasen, die betont auf niedere Ester eingestellt sind, die man also auch häufig durch die Benennung „Esterasen" in einen gewissen Gegensatz zu den „echten" Lipasen der Sekrete bringen will. Es ist jedoch auch hier die Spaltung von Tributyrin von RONA und MICHAELIS erwiesen worden, so daß wir dies Enzym in der Sondergruppe der Organfermente mit abgewandelter Spezifität unter die Lipasen einreihen, trotzdem hier nach PERSIEL 74) die Hydrolyse echter Fette stark in den Hintergrund tritt: sie ist nur mit großen Enzymmengen und besonderer Methodik nachweisbar. Andererseits behaupten neuere Arbeiten auch eine Zerlegung von Olivenöl und schreiben sie einem besonderen Anteil zu, der aus dem Pankreas stammen soll (s. u.).

Blutlipase ist überall nachweisbar, die Wirksamkeit des Serums schwankt indessen ziemlich erheblich (TAKAHASHI 75); er fand die Reihenfolge: Kaninchen, Katze, Pferd, Mensch, Hund, Rind. Bei allen außer Katze und Pferd wirkt bei Messung am Gesamtblut auch die L. der Blutkörper mit. Rattenserum ist sehr arm an L. (MALOWAN 76)).

Ein fettspaltendes Enzym kreist also im Blut; aber ob es dort eine Funktion hat, oder ob es sich um einfach von irgendwoher ausgeschwemmte und auf dem Wege der Rückresorption oder Ausscheidung befindliche Enzymmengen handelt, ist vollkommen unklar, — wie bei allen Enzymen im Blutplasma. Wenn es eine eigene Funktion im Blute hat, so wäre diese eine Fettspaltung im Blutplasma; und eine solche ist bisher

---

74) ***H. Persiel,*** Über Serumesterase u. Pankreaslipase. Inaug. Diss. Univ. München (1925). — 75) ***W. Takahashi,*** Tributyrinspaltung im Blute usw. Arch. ges. Phys. (Pflüger) **225,** 42 (1930) S.A. — 76) ***S. L. Malowan,*** Einfl. des O_2-Mangels auf Lip.-Geh. Zs. exp. Med. **88,** 579 (1933).

auch nicht nachgewiesen. Eine wahrscheinliche Funktion ist wohl die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes Cholesterol ⇄ Ester, das nach dem Tode ganz nach der Seite freies Ch. verschoben wird (SHOPE 77)).

Auf die spärlichen Versuche, dem Enzym eine Funktion zuzuschreiben, kommen wir noch im einzelnen zurück; hier sei zunächst die Frage untersucht, wo das Enzym herstammt, mit anderen Worten, ob es nicht ohne Weiteres als ausgeschwemmte Organlipase zu betrachten ist. Das bezieht sich natürlich nur auf die im Blutplasma resp. im Serum vorkommende Lipase, nicht auf die der Blutkörper, deren Wirkung sich bei Untersuchung zu der Serumlipase addiert; jedenfalls wirkt Gesamtblut stärker als Serum (RONA *und* MICHAELIS *l. c. 202*). Die Lymphocyten und Polynucleären enthalten zweifellos L. (§ 279), aber auch die der Erythrocyten ist gelegentlich festgestellt worden. Man wird also jedenfalls auch die L. des Serums teilweise auf Abgabe aus intakten oder zerfallenen Blutkörpern zurückführen können.

Abb. 3.
Tributyrinspaltung im defibrinierten Blute von: 1. Kaninchen (3 Versuche); 2. Katze (3 Versuche); 3. Pferd (3 Versuche); 4. Mensch (10 Versuche); 5. Hund (5 Versuche); 6. Rind (3 Versuche). Die vertikalen Striche geben die Größe der individuellen Streuung an. Nach TAKAHASHI 75).

§ 275. Herkunft der Blutlipase. Natürlich kann das Enzym nicht in der Blutflüssigkeit selbst entstehen, sondern muß eine Zelle als Produktionsort haben: die Frage ist also nur so zu stellen, ob die Serumlipase nur aus den Blutkörpern stammt, oder aus anderen Geweben oder aus beiden Quellen; ob es also, das Blut als Ganzes betrachtet, eine autochthone Blutlipase gibt. Und auch diese Frage müssen wir zunächst noch daraufhin einengen, wo die normale Blutl. herkommt; denn bei Vergiftungen und pathologischen Prozessen treten Abnormitäten auf, die man eventuell dahin zu deuten hat, daß sich zu der normalen autochthonen Blutl. accessorische, aus anderen Geweben stammende Lipasen addieren, die dann durch bestimmte Eigenschaften kenntlich sind.

Dieses Argument führt uns zu der einen Art von Methode, die normale Blutlipase als etwas Eigenes zu charakterisieren, nämlich den Versuch, ihr besondere Eigenschaften zuzuschreiben, die sie von anderen Lipasen zu unterscheiden gestatten. Diesen Weg ist besonders RONA gegangen, auf grund seiner Studien über die Resistenz gegen Gifte (§ 266a). Er fand zunächst Unterschiede im optimalen ph der Serumlipase gegenüber der Magen- und Pankreaslipase (s. a. § 265); ferner, daß die fördernden mehrwertigen Kationen (Ca^{++} u.s.w.) auf Blutlipase ohne Einfluß sind, während NaF diese viel stärker hemmt. Vor allem aber fand er charakteristische Unterschiede im Verhalten gegen Atoxyl und Chinin sowohl gegenüber Pankreaslipase, wie gegenüber Organ-

77) ***R. E. Shope***, Cholest. Esterase, Jl. of Biol. Chem. 80, 127 (1928).

lipasen; die normale eigentliche Serumlipase ist weder gegen Chinin noch gegen Atoxyl resistent (H.W., S. 490).

Einen Beweis für die reelle Sonderexistenz einer Blutlipase können diese Befunde natürlich nicht liefern: alle diese Eigenschaften können darauf zu beziehen sein, daß sich im Blute das zugehörige System der ursprünglichen Organlipasen so verändert, wie dies anderenfalls auch durch chemische Präparationen erfolgt, welche diese spezifischen Empfindlichkeiten weitgehend verändern. Immerhin spricht die Tatsache, daß man bei Organschädigungen anders geartete L. im Serum finden kann, auf die wir unten im einzelnen eingehen werden, für die Wahrscheinlichkeit einer eigenen Blutlipase, wobei man immer noch der Ansicht sein kann, daß sich neben einer autochthonen, also aus Blutzellen stammenden L. noch regelmäßig, also von pathologischen Zuständen ganz abgesehen, irgendwelche ausgeschwemmten Organlipasen im Serum vorfinden, wofür Befunde von Di Macco 78) und Avellone 79) sprechen. Nach Fiessinger (l. c. 89, 90) stammt die im normalen Serum stets zu findende atoxylfeste L. aus der Thyreoidea. Bačilevis 80) fand ständig chinin- und atoxylfeste L. im Blut, ebenso Avellone (l. c. 116); dagegen l. c. 117. Man hat andererseits versucht, Schlüsse auf die Herkunft daraus zu ziehen, daß man die Menge der Blutlip. bei Reizung oder Ausschaltung der in Frage kommenden Organe untersuchte, oder auch bei Organerkrankungen. Bei alledem ist überaus wenig herausgekommen; meist ist das Material stark kontrovers.

Am nächsten liegt natürlich die Vorstellung, daß es sich einfach um resorbierte **Pankreaslipase** handelt, und diese Frage ist schon seit langem ohne sicheres Ergebnis geprüft worden. Es sei hier zunächst von der sozusagen „normalen" Blutlipase gesprochen; also die andere Frage, ob man eine besondere, die Signatur der atoxylfesten Pankreaslipase tragende und deshalb vermutlich aus dem Pankreas stammende L. bei Störungen der Pankreasfunktion vorfindet, bei Seite gestellt; darüber s. § 275a.

Der gegebene Weg wäre, eine Verminderung der Blutlipase als Ganzes nach Pankreasexstirpation zu finden. Das haben tatsächlich Sorochowitsch 81), Mačela 82) und Jedlicka 83) angegeben, während Gang-Unterbindung nichts ändern soll; jedoch finden sich nach Exstirpation auch garkeine Änderung (Tsudzimura 84)) oder starke Erhöhungen des Titers (s. u.). Gegen einen indirekten Einfluß der inneren Sekretion des Pankreas spricht ein Befund von Tsudzimura 84), daß Injektionen von Insulin ohne Einfluß auf den Gehalt an Serumlip. sind, außer wenn Krämpfe auftreten (dann Erhöhung wegen Eindickung des Blutes).

Versuche, eine direkte Abgabe von L. seitens des Pankreas durch die V. pancreaticoduodenalis an das Blut nachzuweisen, besonders bei Unterbindung (Hiruma *l. c. 203a*) sind abgelehnt worden (Jedlicka 83)); dies soll eben nur bei schweren akuten Schädigungen erfolgen (§ 275a). Die Lipase im Blut der Pankreasvene ist normale Serumlip., nicht atoxylfest (Jedlicka).

---

78) ***G. di Macco,*** Az. del. calore s. sierolip. Riv. di Pat. Sper. **1,** 448 (1926); **2,** 359. — 79) ***L. Avellone,*** Az. d. bile sul pot. tributyr. etc. Riv. di Pat. Sper. **1,** 395 (1926); BPh **39,** 283. — 80) ***J. Bačilevis,*** Klin. Wichtigk. . . . der Blutlip. Ter. Arch. **8,** 673 (russ.); BPh **61,** 781. — 81) ***S. Sorochowitsch,*** Ferm. Geh. des Blutes bei exp. Sympathicotonie. Biochem. Zs. **169,** 409 (1926). — 82) ***J. Mačela,*** Fettinfiltr. der Leber bei exp. Diabetes. Cas. lek. česk. **64,** 1512; BPh **34,** 509. 83) ***Vl. Jedlicka, Vl. Kreisinger,*** Pankr. Lip. im Serum etc. Zs. exp. Med. **47,** 513 (1925). (Lit.). — 84) ***H. Tsudzimura,*** Blutlipase und Insulin. Arch. ges. Phys. (Pflüger) **234,** 250 (1934) S.A.

Injektionen von Pankreaslip. erhöhen den Serumgehalt nur ganz vorübergehend (Baló **85)**, Oliaro **86)**). So hat man indirekte Wege versucht: es soll bei Unterbindung des Pankreas eine echte „Lipase" auftreten, die Olivenöl spaltet, durch Gallensalze aktivirbar ist und sich zur „Esterase" addirt (Crandall **87)**), Chiray **88)**.

Das würde ja nun gerade im Gegenteil besagen, daß die normale Blutlipase als „Esterase" eben nicht aus dem Pankreas stammt, wenn nicht andrerseits sowohl eine solche Lipase wie auch atoxylfeste „Esterase" — ebenso wie ein chininfester Anteil — auch in unbeeinflußten Sera vorkommen könnten (l. c. 80, 116), und ganz prinzipiell eine scharfe Trennung verschiedener Enzyme auf diesem Wege abgelehnt werden muß, da jedes Serum zum mindesten Tributyrin spaltet.

Mit allen diesen Mitteln ist das Problem nicht zu lösen. Fiessinger **89)**, **90)** gibt an, daß sich weder bei Pankreasentfernung (Hund) die atoxylfeste, noch bei weitgehender Wegnahme der Leber die „normale" chininfeste L. im Serum irgendwie ändert. Die normale atoxylfeste L. soll aus der Schilddrüse stammen. Selbst wenn also die L. aus diesen Organen stammt, so nimmt sie wahrscheinlich den Charakter der „echten" Serumlipase an, worauf wir schon eingangs hingewiesen haben; s. dazu auch die Vorbemerkung zu § 275a. Im übrigen fand Tsuji **90)** die Reizung sowohl des Sympathicus (Adrenalin) wie des Vagus (Cholin) ohne jeden Einfluß.

Einen indirekten Zusammenhang mit dem Pankreas kann man insofern konstruiren, als er die vorübergehend gesteigerte Lipasemenge im Serum nach Exstirpation des Pankreas erklären könnte. Das Pankreas scheint nämlich nach Willstätter c. s. **92)** zu seiner Enzymproduktion Leukocyten aufzunehmen und durch Auflösung deren Fermente freizusetzen. Das gilt zwar in erster Linie für die Proteasen, da die Leukocyten in erstaunlicher Ähnlichkeit sämtliche Teilenzyme des Proteasenapparates des Pankreas enthalten; aber wenn überhaupt Leukocyten aufgelöst werden, müssen sie ja auch ihre Lipasen freigeben. Und wenn sie sich bei nicht vorhandenem Pankreas im Blute anhäufen, so könnte das eben zu einer vorübergehenden Vermehrung freigesetzter Leukocytenlipase im Blute führen.

Für die Möglichkeit, daß die Leber auch in der Norm L. ins Blut abgibt, sprechen neben älteren Befunden von Jobling (*l. c. 46a*) (Abnahme der Leberlip. und Zunahme der Blutlip. bei P- und Chloroformvergiftung) Angaben von Prewitt **93)**, **94)**, daß bei direkter Durchblutung der Leber mit Pilocarpin Leberlip. ins Blut übertritt, d. h. die Leberlipase abnimmt zu gunsten der Blutlip., bei intravenöser Gabe von Pilocarpin sind große Dosen nötig.

Beim Hunde wirkt freilich auch Sekretin im analogen Sinne, so daß man wohl eher an einen funktionellen Umweg als an eine direkte Beeinflussung des Leberparenchyms denken muß. Dazu fand wieder Pincussen **95)** Pilocarpin fast ohne Wirkung, während Adrenalin

---

85) ***J. Baló, E. Bach***, Einfl. intravenös inj. Pankr.-Lip. etc. Zs. exp. Med. **75**, 583 (1930). — 86) ***T. Oliaro, J. Adler***, Einfl. parent. zugef. Lip. auf den Lip. Geh. etc. Zs. exp. Med. **91**, 362 (1933). — 87) ***L. A. Crandall, J. S. Cherry***, Specif. . . . of blood and tissue lip. Proc. Soc. Exp. Biol. **28**, 570 (1931); Amer. Jl. Phys. **100**, 266 (1932). — 88) ***M. Chiray c. s.***, Lip. pancr. du sér. sang. Arch. mal. app. dig. **21**, 1137 (1931); BPh **66**, 126. — 89) ***N. Fiessinger c. s.***, Infl. de la pancréatectomie sur . . . lip. Soc. Biol. **112**, 549 (1933). — 90) ***N. Fiessinger c. s.***, Lipases du sérum. Ann. de Méd. **34**, 101 (1933); BPh **76**, 340. — 91) ***R. Tsuji***, Blutesterase. Arch. ges. Phys. (Pflüger) **229**, 344 (1932) S.A. — 92) ***R. Willstätter, E. Bamann*** u. ***M. Rohdewald***, Über Enzyme der Leukocyten. II. u. V. Zs. phys. Chem. **185**, 267 (1929); **188**, 107 (1930). — 93) ***Pr. V. Prewitt***, Lip. prod. by the liver. Amer. Jl. Phys. **65**, 287 (1923). — 94) ***Pr. V. Prewitt***, Eff. of secretin and piloc. upon the blood lip. Amer. Jl. Phys. **73**, 1 (1925). — 95) ***L. Pincussen c. s.***, Veränder. des Ferm. Geh. des Blutes. Biochem. Zs. **161**, 61 (1925).

Abgeschlossen: 20. Mai 1935. Ber. Phys. 84, H. 7/8.

die Blutl. vermindert. Ca^{++} erhöht, K^{+} vermindert die Blutl. PINCUSSEN glaubt nicht an eine Entstehung der Blutl. durch Zellzerfall, sondern an eine Produktion durch das endokrine System (Pankreas ?). Auch der Lipasesturz nach Thyroxin wird von BAUER **96)** auf eine primäre Schädigung der Leber zurückgeführt; ebenso läßt sich die Verminderung nach Phosphorvergiftung deuten, sowie nach sonstigen Leberschädigungen (§ 275a).

Über die Annahme, daß die Lunge Blutlipase abgibt, ist H.W. § 279 berichtet worden; die Frage hat sich inzwischen verschoben, s. b. Lipodihärese § 271a.

Wahrscheinlich setzt sich die Blutlip. aus allen möglichen Provenienzen zusammen und zwar stark wechselnd, aber mit Betonung der Herkunft aus Leukocyten.

Physiologische Bedeutung. Bei der Unklarheit der Herkunft bleibt naturgemäß auch die Frage im Dunklen, ob der Blutlipase irgend eine wesentliche Funktion im Fettstoffwechsel zuzumessen ist, oder besser gesagt, ob ihre Wirkung als Gradmesser für eine solche Funktion zu verwerten ist. Denn an eine wirkliche zahlenmäßig zu bewertende Anteilnahme der Blutflüssigkeit etwa an dem Umsatz der Neutralfette ist nicht zu denken; was man früher als „Lipolyse" im Blut viel diskutiert hat, hat sich als ein Scheinphänomen, als Maskierung des Fettes herausgestellt (*H.W. l. c. 197, 198*). Die Frage ist also nur so zu stellen, ob die Menge an Blutlipase (in der Norm, auch hier zunächst von der Pathologie abgesehen) mit den Bedingungen des Stoffwechsels regelmäßig zusammenhängt. Darüber ist nicht viel Sicheres bekannt.

Natürlich ist in erster Linie immer wieder geprüft worden, ob die Blutlipase irgendwelche sicheren Zusammenhänge mit der Fettaufnahme resp. den damit verbundenen Anreicherungen von Fett im Blut zeigt. ABDERHALDEN hatte eine Vermehrung, also eine physiologische Anpassung gefunden, BACH sie vermißt (*l. c. 209—211*).

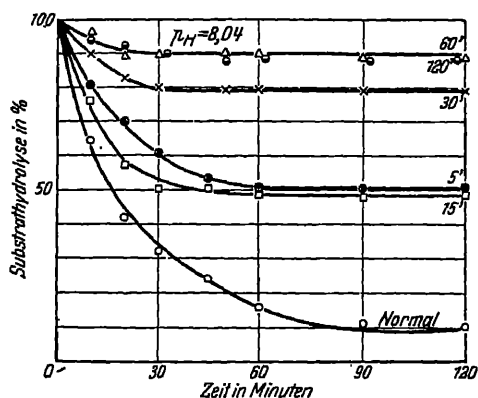



Abb. 4.
Serumlipase während der Hypercholesterinamie bei Hunden, nach REMESOW 97).

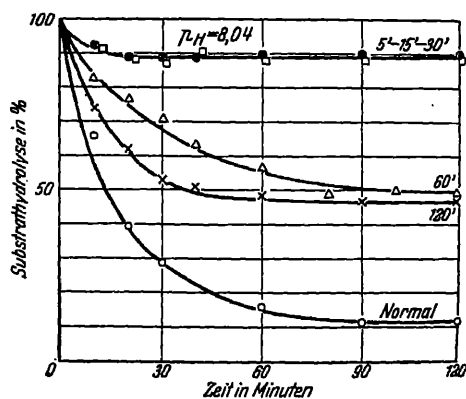



Abb. 5.
Serumlipase während der Lecithinämie bei Hunden, nach REMESOW 97).

Die Dinge liegen aber viel verwickelter, als beim ersten Anschein, weil dieselben Stoffe, die als „Anreiz" für eine erhöhte Bildung von Lipase dienen könnten, rein methodisch den Nachweis sehr erschweren, da sie die Lipase adsorptiv binden und inaktiviren. Dies gilt ebenso für Cholesterol, besonders seine Ester, wie für Phosphatide

96) ***J. Bauer c. s.,*** Sturz der Serumlipase durch Thyroxin. Klin. Ws. **1933,** II 1933, Wiener Med. Ws. **1934,** I, 566.

(REMESOW 97)). Wenn eine Erhöhung des Titers sichergestellt würde, wären dafür wohl zweifellos die am Fetttransport beteiligten Leukocyten, besonders die Lymphocyten, verantwortlich zu machen (§ 276). So deutet ROSSI 98), die von ihm bei Kindern gefundene starke Erhöhung nach parenteraler Zufuhr von Olivenöl und Lecithin, die aber bei Erwachsenen nicht gefunden wurde (99). Eine endgiltige Klärung wäre erst möglich, wenn man sicher sein könnte, nicht mit „maskierter", sondern mit maximal aktivierter L. zu arbeiten.

Eine starke Erhöhung bei Kaninchen und Kühen fanden HORVATH c.s. 100) nach Verfütterung roher Sojabohnen. Da aber mit hocherhitzten Bohnen diese Zunahme ausblieb, so knüpfen sie daran die Vermutung, daß die Blutlipase im ersten Fall z.T. nur umgeformte Lipase der Bohnen selbst ist. Übermaß an roher Bohne soll bei Kühen Übermaß an L. und dadurch Fettnekrosen erzeugen.

Nun entsteht aber Lipaemie auch beim Hungertier, wohl wegen der Heranziehung von Depotfett; hierbei fand AZUMA 101) Vermehrung der Blutlipase bis kurz vor dem Tode, dann Absinken. Auch Bestrahlung führt zur Zunahme der L. (PINCUSSEN 102)). Umgekehrt wirkt erschöpfende Arbeit (SERENI 103)). Bei Zuckerbelastung keine sicheren Ergebnisse (104).

Wiederholte Blutentnahme führte zur Herabsetzung des Gehalts an L., weil lipaseärmere Lymphe nachströmt (TSUJI 105)); bei Pferden keine sicheren Ergebnisse (GRUZEWSKA 106)). Einen Zusammenhang mit dem Lebensalter bei Hunden (nicht Kaninchen) sah SURAM 107): die Blutlipase fällt mit dem Wachstum auf ein Minimum bei ausgewachsenen Tieren. Analoge Beobachtungen am Menschen NITZULESCU 108): Abnahme im Alter, aber ohne Zusammenhang mit dem Grad der Alterserscheinungen.

Bei Feten soll der Titer der Serumlipase höher sein als bei der Mutter (FRANCESCO 109)). NÜRNBERGER 110) findet völlige Unabhängigkeit der Werte von einander. Bei Frühgeburten fand LEDERER 111) in 3 Fällen sehr niedrige Werte; v. GOTTBERG 112) dagegen keine Differenz, wenn die Kinder an sich kräftig waren; bei elenden oder kranken Kindern fand er die Werte ebenso vermindert, wie bei elenden ausgetragenen Kindern. Beim Kleinkind läßt sich kein Normalwert aufstellen (HECKER 113)), jedoch ist bei 70 % gesunder Kinder die Schwankung des Gehaltes gering, ganz junge Kinder haben weniger L., bei 3 Monaten wird die physiologische Lage erreicht (LEDERER 111)). Starke Schwankungen bei demselben Kind (POVORINSKAJA 114)).

§ 275a. Pathologie der Blutlipasen. Aus den zahlreichen Arbeiten, die sich mit der Messung der Blutl. bei allerlei pathologischen Prozessen beschäftigen, ist nur eins mit Wahrscheinlichkeit herausgekommen: daß nämlich häufig Organlipasen ins Blut

---

97) ***J. Remesow* c. s.,** Blutlipase etc. Zs. exp. Med. **87**, 613 (1933) S.A. — 98) ***V. Rossi,*** Comport. d. lip. del siero etc. Clin. pediatr. **14**, 175 (1932); BPh **67**, 750. — 99) ***E. Cherbuliez* c. s.,** Infl. de l'introd. . . . d'huile etc. C. R. Soc. Phys. Genève **49**, 150 (1932). — 100) ***A. A. Horvath, H. C. Chang,*** Eff. of soy-bean-feed. on the blood lip. Amer. Jl. Phys. **78**, 224 (1926). — 101) ***T. Azuma,*** Stud. on serumlip. Jl. of Biochem. **4**, 239 (1924). — 102) ***L. Pincussen, T. Takuma,*** Stoffw. unter Bestrahl. Bioch. Zs. **228**, 341 (1930). — 103) ***E. Sereni,*** Ferm. del sangue nella fatica. Arch. di Fis. **21**, 501 (1923); **27**, 137. — 104) ***Minker-Bogdanowa* c. s.,** Blutlip. nach Zuckerbelast. Russk. Fiz. Ž. **13**, 204 (1930); BPh **57**, 96. — 105) ***R. Tsuji,*** Blutesterase, Arch. ges. Phys. (Pflüger) **229**, 344 (1932) S.A. — 106) ***Z. Gruzewska, G. Roussel,*** La lip. du sérum. C. R. **193**, 786 (1931). — 107) ***V. Suram,*** Ferm. Funkt. des Blutes. (russ.) BPh **50**, 400 (1928). — 108) ***J. Nitzulescu* c. s.,** Lip. sériques. Soc. Biol. **114**, 747 (1933). — 109) ***S. di Francesco,*** Pot. lipol. del sangue. Fol. Gynec. **28**, 121 (1926); BPh **39**, 832. — 110) ***L. Nürnberger,*** Lipasebest. im mütterl. und kindl. Blut. Arch. für Gynäkol. **139**, 1 (1929); BPh **56**, 156. — 111) ***M. Lederer,*** Parall. Unt. über . . . Lipasegehalt d. Blutes etc. M.-S. Kind. **27**, 608 (1924). — 112) ***v. Gottberg,*** Serumlipase der Frühgeburten. M.-S. Kind. **29**, 51 (1924). — 113) ***E. Hecker, J. Vierhaus,*** Lipasegehalt im Serum etc. Zs. Kind. **38**, 466 (1924). — 114) ***S. Povorinskaja,*** Blutlip. bei Kindern. Russk. fiziol. Ž. **13**, 745 (1930); BPh **61**, 296.

gelangen. Dagegen ist der diagnostische Wert der Bestimmungen sehr gering, vgl. auch bei Blutfermenten im H.W., Allg. T. §§ 209, 244; allgemein betrachtet hat sich seitdem nicht viel verändert.

Zunächst seien die Fälle erwähnt, daß man **abnorme Lipasen** im Serum gefunden hat, die auf bestimmte Organe deuten, wobei die allgemeinen Bedenken gegen eine solche Differenzierung nochmals in Erinnerung gebracht seien. Ein strikter Beweis, daß die so „markierten" Lipasen wirklich von den betroffenen Organ abgegeben werden, ist nicht zu führen. Es kann sich immer wieder um Änderung des Milieus handeln, z. B. um pathologische Produktion von Stoffen, welche die Resistenz der Serumlipase an sich erhöhen. Eine solche Beobachtung ist z. B., daß die Chininresistenz der Seruml. bei Leberschädigungen nicht auf Austritt von Leberlipase beruht, sondern auf einer Wirkung der Cholate auf die Seruml. selbst (s. u.).

Auch die Befunde an sich scheinen zu wechseln, z.B. vorwiegend negative Resultate bei KOBRYNER **115)** (normale Serumlipase bei Erkrankungen von Leber und Pankreas). AVELLONE **116)** fand überall, normal und bei Krankheiten, etwas atoxyl- und chininfeste L. im Serum, diagnostische Schlüsse sind daraus nicht zu ziehen. Bei Lungen-tbc. sind die giftfesten L. vermindert. Dagegen hat MELLI **117)** niemals atoxylfeste „Pankreaslip." im normalen Serum finden können. Auch eine echte „Lipase" kann sich im Serum vorfinden (Olivenöl), die aus dem Pankreas stammt und nach Unterbindung der Gänge, Reizung durch Sekretin-Pilocarpin zunimmt (CHIRAY l. c. 88, CRANDALL l. c. 87).

Da **Pankreaslipase** im Gegensatz zur Seruml. (beim Menschen) atoxylfest ist, hat man sie bei Pankreaserkrankungen gesucht. Sie scheint nur bei akuten destruierenden Veränderungen aufzutreten, sowie bei Diabetes.

Positive Befunde: bei Nekrosen MARCUS **118)**, JORNS **119)**, KWILECKI **120)**, SCHMITT **121)**, BERNHARD **122)**; bei experimentellen Verschorfungen GRASSBERGER **123)**; bei Unterbindung der Gänge, auch des Gallenganges (beide beim Hund, also chininfeste Lip.) D'IGNAZIO **124)**, WEIL **125)**.

Bei akuter (wenig bei chronischer) Pankreatitis, Stenosen des Duct. WIRSUNGIANUS CICERI **126)**, ebenso D'IGNAZIO **124)**; bei allerlei Pankreaserkrankungen RAEVSKAJA **127)**, bei penetrierendem Ulcus ventriculi oder duodeni im akuten Stadium SCHMITT **121)**, bei Resektionen des Magens (Verletzung des Pankreas) GRASSBERGER **123)**; in etwa 50 % DIBOLD **128)**; nach JORNS **129)** nur, wenn dabei das Pankreas selbst erkrankt ist. In 4 Fällen von Carcinom des Pankreas negativ (JEDLICKA l. c. 83), positive Befunde SCHMITT **121)**.

Bei Cholecystitis, Diabetes, Hyperthyreosen überwiegend positiv (PAZZI DEMUR-

---

115) ***A. Kobryner,*** Die diagn. Bedeut. der Lip. im Blutserum. D. Arch. klin. Med. **155,** 353 (1926). — 116) ***L. Avellone, M. Mattina,*** Sierolip. II. Fol. Clin. Chim. Micr. **2,** 467 (1927); BPh **44,** 664. — 117) ***G. Melli, A. Lorenzi,*** Lip. del siero etc. Minerva Med. **1930,** II, 361; BPh **59,** 485. — 118) ***M. Marcus,*** Diagn. d. akuten Pankr. Erkr. Klin. Ws. **1923,** 1356, 2366. — 119) ***G. Jorns,*** Ferm. Diagn. der Pankr. Erkr. Arch. für Klin. Chir. **163,** 657 (1931). — 120) ***D. Kwilecki,*** Über den Nachweis atoxylresist. Lip. im menschl. Blutserum. Arch. Verdau. **37,** 336 (1927). — 121) ***K. Schmitt,*** Lipasebest. im Blutserum. Arch. für Klin. Chir. **174,** 510 (1933). — 122) ***F. Bernhard,*** Lip. Best. in der Diagn. etc. Klin. Ws. **1933,** I, 221. — 123) ***A. Grassberger,*** Diastase und Lip. im Blut etc. Mitt. Grenzgeb. **41,** 1; ***Ders.,*** Ferm. Unt. im Blut bei Pankr. Erkrank. D. Zs. Chir. **210,** 293 (1928). — 124) ***C. d'Ignazio,*** Lip. del siero nel cane. Fis. e Med. **2,** 259; **3,** 432 (1932); BPh **68,** 173; **70,** 321. — 125) ***A. Weil, L. A. Crandall,*** Rel. betw. lip. a. neurotox. action of dogs serum. Proc. Soc. Exp. Biol. New York **29,** 388 (1932). — 126) ***C. Ciceri,*** Lip. pancr. nel siero etc. Ann. ital. chir. **12,** 242 (1933); BPh **73,** 547. — 127) ***G. Raevskaja,*** Bauchsp.-Funktionsprüf. Ter. Arch. **8,** 347 (1930) (russ.); BPh **57,** 325. — 128) ***H. Dibold, M. Taubenhaus,*** Atoxylres. Lip. etc. Klin. W. **1933,** I, 857. — 129) ***G. Jorns,*** Atoxylfeste Lip. im Serum nach Magenres. Klin. Ws. **1934,** 1054.

TAS 130)), D'IGNAZIO, SCHMITT, KUNOS 131), bei Kombination mit Lebercirrhose FIESSINGER (l. c. 142); außerdem bei chronischen Darmkatarrhen. Anaemia perniciosa positiv (SIMON 132), KUNOS 131)).

Nach POPPER 133) ist die Reaktion ziemlich unregelmäßig zu finden bei allerlei Affektionen des Pankreas, der Gallenwege, Anaemia pernic., Diabetes, Tumoren; ebenso BERNHARD 122).

Negative Befunde z.B. BLOCH 134), ALLODI 135). Weder bei normalen Schwangeren noch bei Eklampsie u. dgl. NÜRNBERGER (l. c. 110).

Chininfeste Leberlipase ist vielfach bei toxischen Störungen der Leberfunktion und bei akuten Erkrankungen der Leber im Serum aufgefunden worden. Nach den ersten Beobachtungen von RONA c. s. und SIMON (*l. c. 207, 208*) ist dann eine Flut von klinischen Veröffentlichungen darüber erschienen, die sämtlich zu citieren ebenso unmöglich wie überflüssig ist, da die meisten die Hauptsache immer wiederholen, nämlich das Auftreten der chininfesten L. bei akuten Parenchymschädigungen, während sie sonst das gewohnte Bild der beliebigen Variationen in Einzelbefunden und in der diagnostischen Verwertbarkeit liefern.

Einheitlich wird betont das Auftreten bei akuten diffusen Lebererkrankungen (MEYER und JAHR 136)), POLACK 137), FRIESZ 138), auch bei entzündlichen immer (ALLODI 135)) oder meist (AKIYAMA 139)), und bei Malaria (140).

Andererseits fehlt sie bei Cirrhose, Carcinom (MEYER c. s. 136)) und überhaupt bei chronischen Krankheiten (D'IGNAZIO l. c. 124). Weiterhin hat sie KRÖMECKE 141) vermißt bei experimentellen Leberschädigungen durch Röntgenstrahlen oder Unterbindung des Ductus choledochus. Im Gegensatz dazu fand FIESSINGER 142) bei Leber-cirrhose neben einer Verminderung der L. überhaupt auch chininfeste L. in 13 von 18 Fällen. Ebenso fehlt diese chininfeste L. bei solchen Zuständen, bei denen nur Gallenfarbstoffe austreten, auch beim Icterus neonatorum (BLOCH l. c. 134) und nach Toluylendiamin (KRÖMECKE, AVELLONE 143)).

Andererseits tritt Chininresistenz der L. im Serum auf bei Vergiftungen, so nach Alkohol (DI MACCO 144)), Phosphor (AVELLONE 145)), Chloroform (PAZZI DEMURTAS 146)), KESSEL 147)). Für diese Fälle geben AVELLONE und DI MACCO (vgl. a. § 275) eine sehr interessante Erklärung, die vielleicht auch auf Leberkrankheiten auszudehnen wäre. Wenn sie zutrifft — Nachprüfungen resp. Widerspruch habe ich nicht gefunden —, so wäre das ganze Kapitel „Leberlipase im Blut" neu aufzurollen, soweit es nicht rein klinisch-diagnostische Zwecke einschließt. Nach ihrer Meinung handelt es sich nämlich überhaupt nicht um Übertritt von Leberlipase ins Blut, sondern um Übertritt von mehr als normalen Mengen von Gallensauren Salzen, da diese

130) ***M. Pazzi Demurtas***, Diabete e lip. pancr. Bioch. Ter. Sper. **18**, 421 (1931). — 131) ***St. Kunos*** u. ***A. Gerö***, Klin. Bedeut. der atoxylresist. Lip. des Blutserums. Arch. Verdau. **50**, 232 (1931). — 132) ***H. Simon***, Atoxylres. Lip. im Serum etc. Klin. Ws. **1925** (II) 2295. — 133) ***H. L. Popper***, ***R. Scholl***, Verwertb. der Lip.-Best. etc. Med. Klin. **1934**, I, 335; BPh **79**, 430. — 134) ***E. Bloch***, Blutfremde Ferm. im Serum. Klin. Ws. **1928**, 1793. — 135) ***A. Allodi***, ***G. Palomba***. Ric. d. lip. etc. Policlin. Sez. Med. **37**, 376 (1930); BPh **58**, 374. — 136) ***W. Meyer***, ***J. Jahr***, Chininres. Lip. im Serum. Mitt. Grenzgeb. Med. Chir. **38**, 223 (1924). — 137) ***E. Polack***, Organspez. Lip. im Serum. Acta Med. Skand. Suppl. **26**, 49 (1926); BPh **46**, 775. — 138) ***J. Friesz***, ***J. Hallay***, Serumlip. bei Leberkrkh. Zs. Klin. Med. **113**, 275 (1930). — 139) ***T. Akiyama***, Fibrinogen u. Lip. d. Blutes bei Leberkrkh. Jap. Ges. Inn. Med. **1926**, 28; BPh **42**, 695. — 140) ***J. N. Dimitrijevič***, Chininresist. Lip. im Serum Malariakr. Wiener Arch. Inn. Med. **9**, 499 (1925). 141) ***Fr. Krömecke***, Serum- u. Organlip. Arch. für exp. Path. **100**, 77 (1923). — 142) ***N. Fiessinger***, ***A. Gajdos***, Lip. sang. au cours des cirrh. du foie. Rev. méd. Mal. Foie **3**, 317 (1934); BPh **84**, 310. — 143) ***L. Avellone***, Comp. d. sierolip. nel ittero hemolit. Riv. Pat. Sper. **2**, 353 (1927); BPh **44**, 128. — 144) ***G. di Macco***, Lip. . . . del siero nel alcoolismo. Riv. Pat. Sper. **5**, 306 (1930); BPh **57**, 652. — 145) ***L. Avellone***, Comp. d. sierolip. nella intoss. da fosf. Riv. Pat. Sper. **1**, 385; BPh **39**, 283. — 146) ***M. Pazzi Demurtas***, Az. d. anestet. s. tasso lipas. Bioch. Ter. Sper. **17**, 33, 402 (1930). — 147) ***F. Kessel***, Einfl. der Chlorof. Narkose auf Blutlip. (Russ.) BPh **36**, 649.

an sich die Chininresistenz der Serumlipase erhöhen (§ 275). Wo diese Ausschüttung fehlt, tritt auch die „Leberlipase" nicht auf, so nicht bei einfachen Austritt von Gallenfarbstoffen ohne Parenchymschädigung und auch nicht oder nicht häufig bei chronischen Erkrankungen, Tumoren etc.

Sonstiges Auftreten von „Leberlipase" im Blut: nach Salvarsaninjektionen meist negativ (von 21 Fällen 3 positiv) (MEYER u. BUSCHKE **148**), dort noch ältere z.T. kontroverse Lit.). Bei anderen Organerkrankungen positiv: bei Nierenkrankheiten u.a. RONA **149**), SIMON **150**) (*l. c. 208*); bei Psychosen gelegentlich (BÜCHLER **151**)), ohne Rücksicht auf die besondere Krankheitsform, regelmäßig positiv bei manisch-depressiven Psychosen, wo die Leber stets eine Rolle zu spielen scheint.

Nebennierenlipase soll im Blut dadurch nachweisbar sein, daß sie im Gegensatz zur Seruml. chininfest, im Gegensatz zu anderen Organlipasen gegen Chloralhydrat empfindlich ist (TSCHEBOKSAROW **152**)). So hat sie JORNS **153**) bei hypernephroiden Tumoren gefunden.

Schilddrüsenlipase, arsenresistent, tritt bei BASEDOW auf (INTROZZI **154**, **155**)). Nach FIESSINGER (l. c. 90) ist diese L. aber auch atoxylfest, sie bildet anscheinend den normal vorkommenden Anteil solcher L. im Serum, vermindert nach Thyreoidektomie, vermehrt nach Thyroxin.

Lungenlipase: bei Tbc., Pneumonie, Lungentumoren SIMON (l. c. 132).

Carcinomlipase (atoxylfest) häufig bei Tumorkranken (SCHMITT l. c. 121), BERNHARD **156**).

Pathologische Schwankungen des Gehaltes des Blutes. Man hat bei den verschiedensten Krankheitsbildern die Konzentration des Blutes an L. untersucht, ohne zu differenzieren, ob es sich um die eigentliche Blutlipase oder abweichende Enzyme handelt. Auch dabei ist herzlich wenig herausgekommen; allenfalls das Ergebnis, daß bei schweren Schädigungen und Darniederliegen des Zellstoffwechsels auch die lipatische Wirkung des Blutes, mitunter sogar erheblich, zurückgeht. Besonders soll dies nach MELIS-SCHIRRU (*l. c. 225*) bei einer Beeinträchtigung des lymphatischen Apparates der Fall sein.

Das würde also in gewissem Sinne auf eine reelle Verminderung des Enzyms durch Störungen an den Produktionsorten deuten; es ist aber durchaus noch nicht klar, ob und inwieweit eine solche Abnahme des Enzyms überhaupt vorliegt. Es kann sich um alle möglichen Formen von verminderter Wirkung bei an sich gleichbleibender Enzymmenge handeln, von wahren Hemmungen oder Maskierungen durch adsorbierende Stoffe. So weisen z. B. EDELMAN (1923) und REMESOW **157**), **158**) darauf hin, daß bei allen Zuständen der Cholesterol-Vermehrung im Blut die L. fast völlig unwirksam ist, da sie adsorbiert wird; auch die Abnahme bei Krankheiten (Lues, Arteriosklerose) (DÖRLE **159**)) und in der Schwangerschaft (s. u.) läßt sich derart deuten. Phosphate

148) ***W. B. Meyer, F. Buschke***, Chininfeste Lip. im Serum. Klin. Ws. **1927**, I, 987. — 149) ***P. Rona, H. Petow c. s.***, Blutfremde Lip. im Serum. Klin. Ws. **1923**, 1248. — 150) ***H. Simon***, Prakt. Bed. chininresist. Serumlip. Klin. Ws. **1926**, 2443; BPh **40**, 436. — 151) ***P. Büchler***, Chininfeste Serumlip. in psych. Bezieh. Monatsschr. Psych. Neur. **57**, 127 (1924). — 152) ***M. Tscheboksarow, S. Malkin***, Nebennierenlip. Klin. Ws. **6**, 1472 (1927). — 153) ***G. Jorns***, Nachw. von Nebennierenlipase etc. Arch. Klin. Chir. **172**, 781 (1933). — 154) ***P. Introzzi***: Il valore diagn. d. ricerca nel siero di sangue delle lipasi d. organi. Minerva med. **8**, 20 (1928). BPh **49**, 539. — 155) ***P. Introzzi***, Lip. resist. all arsenico nel siero etc. Boll. Soc. Med. chir. Pavia **5**, 853 (1928). BPh. **48**, 816, **50**, 269. — 156) ***Fr. Bernhard***, Atoxylfeste Lip. im Serum bei Carc. Zs. Krebsf. **38**, 450. BPh **78**, 58. — 157) ***J. Remesow***, Veränd. d. Blutes b. d. exp. Cholesterin-Atherosklerose. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **221**, 534 (1929). S.A. — 158) ***J. Remesow c. s.***, Blutlip. . . . während exp. hervorger. Lipaemien. Zs. exp. Med. **87**, 613 (1933). S.A. — 159) ***M. Dörle, H. v. Weiss***, Fettspalt. Verm. und Cholest. Spiegel etc. Bioch. Zs. **167**, 395 (1926).

wirken durch Ablösung aus dieser Adsorption aktivierend. Durch Herbeiführung künstlicher Hypercholesterol-ämie und ebenso Lecithinämie läßt sich dies experimentell reproduciren (Hund > Kaninchen) (vgl. die Kurven S. 66). Am stärksten wirken die Ester des Ch. Insulininjektionen erhöhen die L. nach REMESOW nur dadurch, daß sie das Ch. im Blute vermindern.

So seien denn ohne jedesmalige Kritik die einzelnen Angaben über **Herabsetzungen der Wirksamkeit** zusammengestellt: es ergibt sich als einzig sicheres Resultat die starke Verminderung bei allen Formen von Darniederliegen der Stoffwechselvorgänge überhaupt.

Allgemein bei Schwerkranken und Moribunden jeglicher Art: AVELLONE **160)**, bei allgemeiner Kachexie KATZENELBOGEN **161)**.

Hierher dürfte wohl auch die bisweilen vorhandene Herabsetzung bei pankreatektomirten Hunden zu rechnen sein (s. o.), da bei Diabetes an sich eher Vermehrung vorzukommen scheint. Auch an Leichenmaterial fand BACH **162)** Herabsetzungen nach kachektischen Krankheiten, schwerer Tbc., Urämie; Erhöhung nach Infektionskrankheiten.

Tuberkulose *). Hier gehen mehrere Fragen durcheinander. Erstens ist behauptet worden, daß die Tbc. an sich mit einer Herabsetzung der Blutl. einhergeht, ja sogar, daß die Disposition zur Tbc. auf einem Mangel an L. als dem wichtigen Abwehr-Agens gegen die Tbc-Bazillen beruht. Diese z. B. von CAPPELLI **163)** vertretene Ansicht hängt mit den unklaren Beziehungen der Lymphocyten-Lipase zur Tbc. zusammen (§ 276) und somit auch mit den Angaben über eine das Wachs der Tuberkelbazillen zerstörenden „Cerase", die in den Raupen der Wachsmotte *Galleria* vorkommen soll. (§ 268).

Zweitens aber ist behauptet worden, daß der Gehalt an Lipase bei Tuberkulösen ein Gradmesser für die Aggressivität der Bakterien sein soll in dem Sinne, daß maligne Formen der Tbc. niedrige, gutartige höhere Lipasewerte haben sollen.

Dieser zuerst von KOLLERT und FRISCH (*l. c. 220*) verfochtenen These ist mehrfach beigestimmt worden. (NICOLAU **164)**, DELHOUGNE **165)**, GRADNAUER **166)**; ALTSCHULER **167)** mit Vorbehalten bezgl. der Prognose). SCHRANZ **168)** sah nach operativer Entfernung von tbc. Knochen die L. ansteigen, wenn Besserung (lokal und allgemein) erfolgt, sonst absinken. VIRTANEN **168a)** fand bei experimenteller Tbc. (*Cavia*) Absinken in Blut, Leber, Pankreas, nicht in Lunge (§ 278).

Aber häufiger ist die Idee abgelehnt worden. So leugnet HENZSCHKE **169)** jede diagnostische Bedeutung, BACH **162)** findet an Leichenmaterial Abnahme nur bei langdauernder Tbc., nicht bei akuten wenn auch schweren Fällen. Auch bei tbc. Schwangeren ist nach **170)** die Abnahme um so erheblicher, je fortgeschrittener der Prozess ist (s. a. l. c. 186) YASUDA **171)**

*) Es ist unmöglich, sämtliche Arbeiten über dieses Thema zusammenzustellen. Im übrigen auch wertlos, da alle erdenklichen Ansichten bereits in dieser Blütenlese zu finden sind. Mangels einer scharfen Kontrolle der Milieubedingungen sind sozusagen alle diese Arbeiten, wie sie ergebnislos sind, auch wertlos. Man findet weitere Lit. in den cit. Arbeiten.

160) ***L. Avellone, G. Colajanni,*** Ric. sulla sierolip. I. Fol. Clin. Chim. Micr. **2**, 455 (1927); BPh **44**, 664. — 161) ***S. Katzenelbogen, H. Wohlers,*** Pouv. lipolyt. du sérum. Ann. de Méd. **20**, 373 (1926); BPh **38**, 733. — 162) ***J. Bach, L. Lusztig,*** Lipaseunt. an Leichenmaterial Mag. Orv. Arch. **32**, 301 (1931); BPh **65**, 633. Arch. Path. (VIRCHOW) **280**, 325 (1931). — 163) ***G. Cappelli,*** Stud. s. lip. II, Giorn. Med. Mil. **73**, 181; BPh **36**, 881. — 164) ***J. Nicolau c. s.,*** Titre d. la lip. sang. etc. Arch. Roum. Path. **1**, 437 (1928); BPh **49**, 83. — 165) ***Fr. Delhougne,*** Ferm. Geh. des Blutes bei Tbc. D. Arch. klin. Med. **165**, 371 (1929). — 166) ***A. Gradnauer,*** Serumlip. bei Tbc. des Kindes. Beitr. Klin. Tbk. **77**, 725 (1931); BPh **64**, 377. — 167) ***M. M. Altschuler,*** Geh. d. Blutes an lipol. F. etc. Beitr. Klin. Tbk. **74**, 479; BPh **59**, 163. — 168) ***H. Schranz,*** Verh. der Serumlip. bei chirurg. Tbc., Arch. für Klin. Chir. **184**, 200 (1925). — 168a) ***A. I. Virtanen, P. Suomalainen,*** Lipol. activ. of diff. organs during tbc. Nature **133**, 532 (1934). 169) ***E. Henzschke, H. Zwerg,*** Bed. d. Seruml. bei Lungentbc. Beitr. Klin. Tbk. **58**, 324 (1924); BPh **28**, 139. — 170) ***M. Yoshida,*** Fat in blood and lipol. f. in blood serum (jap.) BPh **41**, 223. — 171) ***R. Yasuda,*** Lip. Geh. des Harns und Blutserums etc. Tohoku Jl. Exp. Med. **20**, 265 (1933).

fand keine nennenswerten Abweichungen von der Norm (geringe Erhöhung des Mittels bei sehr starker Streuung). Bei Knochentbc. haben GRADNAUER und ALTSCHULER auch Erhöhungen gefunden.

Ähnlich steht es bei **Tumoren**; auch hier scheinen wesentliche Verminderungen erst bei Kachexien aufzutreten, doch ist auch dies nicht klar, vielleicht bringt der Tumor an sich eine Verminderung der Wirkung durch Hemmungskörper hervor (vgl. z. B. SHAW-MACKENZIE 172).

Sauerstoffmangel (Unterdruckkammer) ohne Einfluß (MALOWAN 173)), ebenso Injektionen von Radon (Ra-Emanation) (VIDAL 174)).

Leberschädigungen setzen herab: Strahlenschädigung (PINCUSSEN, l. c. 102), Röntgenstrahlen, hepatotoxisches Serum, aber auch Erkrankungen (Cirrhose, Tumoren) (KAMEO 176)) Phosphorvergiftung (v. FALKENHAUSEN 177)). Bei Malaria keine Veränderung, bei Chininbehandlung sehr geringe Abnahme (TUDORANU 178)). Bei Ernährungsstörungen tritt die Verminderung ebenfalls erst bei schweren Störungen (Toxikosen) auf (H.W. S. 492). Eine Verminderung nach Einführung von Proteinen (Reizkörpertherapie) sah ADLER 179), Verminderung bei Skorbut PALLADIN 180)); bei Vitamin A-Mangel (Ratte, Hund, Zunahme bei Gabe von Vitamin A) GREEN 181).

Bei **Schwangerschaft** sehr verschiedene Befunde, sowohl was die Menge wie auch das Verhalten gegen Gifte, also Auftreten blutfremder L. anlangt. Es liegt dies z. T. daran, daß — wie schon mehrfach betont, vgl. REMESOW (l. c. 157) — die Zahlenangaben garnicht durch die wirkliche Menge an L., sondern durch die mehr oder minder starke inaktivierende Adsorption an das bei der Gravidität vermehrte Cholesterol im Blut bestimmt sind.

So deutet z. B. FRANCESCO 182) die dauernde Wirkungsverminderung bei fortschreitender Gravidität, das plötzliche Zunehmen nach der Entbindung. Ebenso erklärt VALLE 183) seine unsicheren und wechselnden Befunde in Bezug auf Menge und chininfeste L. HERMANN c. s. 184) geben an: starke Abnahme im Beginn, dann langsames Ansteigen, ohne die Normalwerte zu erreichen. Demgegenüber gibt CLAUSER 185) starke Abnahme und Auftreten von chininfester Leberl. an, und MIZUHARA 186) findet die Abnahme noch im Puerperium stark (auf 50 %), ferner bei Tbc. während der Gravidität. HINTNER 187) fand bei Kaninchen überhaupt keine Veränderungen, auch nicht nach Resorption der Feten.

Bei Geisteskranken nach älteren Arbeiten Minderung. Bei multipler Sklerose „Lipase" erhöht, „Esterase" normal (CRANDALL 188), 189)), wahrscheinlich indirekt über

---

172) ***J. A. Shaw-Mackenzie,*** Blood tests in the diagn. of canc. Jl. of trop. Med. **32,** 290 (1929). — 173) ***S. L. Malowan,*** Einfl. des Sauerstoffmangels auf Lip.-Gehalt etc. Zs. exp. Med. **88,** 579 (1933). — 174) ***C. Vidal,*** Act. des sol. de radon s.l. pouv. lipol. du sang. Soc. Biol. **109,** 495 (1932). — 176) ***T. Kameo,*** Einfl. der Leberschäd. auf Serumlip. Jl. of Biochem. **15,** 229 (1932). — 177) ***M. von Falkenhausen,*** Exper. P- Vergift. auf die Verdau- F. des Blutes. Arch. für exp. Path. **132,** 106 (1928). — 178) ***G. Tudoranu c. s.,*** Lip. sér. chez les paludéens. Soc. Biol. **116,** 1117 (1934); BPh 82, 435. — 179) ***E. Adler,*** Serumlipase. D. med. Ws. **1927,** 1937. — 180) ***A. Palladin, P. Normark,*** Blutferm. bei exp. Skorbut. Bioch. Zs. **152,** 420 (1924). — 181) ***H. N. Green,*** Fat metabol. in vitamin-A. def. Biochem. Jl. **28,** 16 (1934). — 182) ***S. di Francesco,*** Pot. lipol. del sangue. Fol. gyn. **23,** 121 (1926); BPh **39,** 832. — 183) ***G. Valle,*** Lipasi in ostetricia etc. Ann. di ostetr. **54,** 1297 (1932); BPh **72,** 508. — 184) ***E. Herrmann, Fr. Kornfeld,*** Über den Fermentgeh. des Serums in u. außerhalb der Schwangerschaft. Wien. Arch. f. innere Med. **12,** 469 (1926). — 185) ***F. Clauser,*** Ferm. lipol. nel. . . . sangue d. gravida. Riv. ital. gin. **3,** 83 (1924); BPh **30,** 436. — 186) ***S. Mizuhara,*** Über die Serumlip. von Schwangerschaft usw. (jap.). Ber. ges. Phys. **38,** 290 (1927). — 187) ***H. Hintner,*** Einfl. von abnormen Resorpt. Vorg. . . . auf die Blutlip. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **226,** 292 (1931) S.A. — 188) ***L. A. Crandall jr., J. S. Cherry,*** Olive oil splitting lipase in . . . mult. scler. Proc. Soc. Exp. Biol. **28,** 572. — 189) ***L. A. Crandall Jr., J. S. Cherry,*** Blood lip. . . . in mult. scler. Arch. of Neur. **27,** 367 (1932); BPh **67,** 108.

Leberwirkung. Bei Lues vermindert, meist parallel mit Ansteigen des Cholesterol-Gehaltes (v. Weiss **190**)).

Toxische Einflüsse. Injektionen von Thyroxin (0,5 mg) führen zu einem plötzlichen Absinken (30—60 %) der Serumlipase **(191—193)**. Bei fortgesetzten Injektionen nimmt die L. immer weiter ab, bis prämortal ein Anstieg erfolgt, aber dieser ist einer atoxylresistenten L. zuzuschreiben, nach Fiessinger (l. c. 90) aus der Schilddrüse selbst. Dabei ist die Leber der primäre Angriffsort, da auch deren L. absinkt (Niere, Milz nicht) (Bauer **194**)). Das Reticuloendothel ist nicht beteiligt; Insulin ist ohne Einfluß. Verfütterung von Blutlipoiden schützt; auch Olivenöl etwas (Hoffmann **194a**)); Zufuhr von Antithyreoidin (aus Blut gewonnen) verhindert das Absinken.

Histaminschock (*Gavia*, Katze): Abnahme gleichlaufend mit Abnahme der Konz. der Serumproteine, doch nicht regelmäßig (Stefanutti **195**)). Urethannarkose: bei Kaninchen Verminderung (Takahashi, l. c. 75).

Vigantol in großen Dosen ohne Einfluß. Der Einfluß der starken Bestrahlung (l. c. 102) auf die L. beruht also nicht auf einer Vitaminisierung (Schwerdt **196**)) — Arsenpräparate ohne Einfluß, wenn nicht toxische Allgemein-Erscheinungen, dann Abnahme. — Bactericide Farbstoffe ohne Wirkung **(196a)**.

Vermehrung der Serumlipase ist früher (s. H.W. S. 492) mehrfach angegeben worden. z. B. bei Adipositas, Nephritis, Arteriosklerose, Rachitis. Soweit es sich um die normale Serumlipase handelt, sind neuere Angaben mir nicht zu Händen gekommen, bis auf eine Vermehrung bei Diabetes (Dörle **197**)) und (am Leichenmaterial) bei Infektionskrankheiten (Bach l. c. 162).

In vielen Fällen scheinen die älteren Angaben dadurch ihre Erklärung zu finden, daß zwar die Gesamtwirkung der L. verstärkt war, daß aber abnorme L. aufgetreten sind, was man ja derzeit nicht messen konnte. Dies gilt insbesondere wie ausführlich geschildert für atoxylfeste (Pankreas-) und chininfeste (Leber-) Lipasen. In anderen Fällen mag es sich auch hier nicht um die wirklich vorhandenen Mengen an L. gehandelt haben, sondern um Änderungen in der Maskierung; besonders die Beziehungen zwischen dem Gehalt des Serums an freiem und verestertem Cholesterol und der Wirksamkeit der L. sind ja noch nicht genügend exakt aufgeklärt.

§ 267. **Lymphen und Transsudate**: Die Serumlipase geht natürlich auch in alle Blutfiltrate über. In Exsudaten addiert sich dazu wieder die aus den Zellen ausgetretene L., so daß man u. U. dadurch Exsudate von Transsudaten unterscheiden kann. Neuere Angaben dazu:

Lymphe: Terashima **198**) fand volle Identität mit der L. des Blutes, aber weniger an Menge. Ductus thoracicus: Kálló **199**) fand schwankende Mengen, bald mehr, bald weniger als im Blut, Tsuji **200**) stets weniger. Kálló nimmt an, daß die Lip. aus den Organen der Bauchhöhle stammt und auf diesem Wege ins Blut gelangt, was also mit der ungeklärten Frage der Entstehung der Seruml. zusammenhängt.

---

190) ***H. v. Weiss, M. Dörle,*** Fettspalt. Verm. und Chol. Geh. Bioch. Zs. **171**, 225 (1926). — 191) ***E. Bach c. s.,*** Wirk. des Thyroxins auf Serumlip. Arch. exp. Path. **165**, 614 (1932). — 192) ***J. Bauer, M. H. Hoffmann,*** Sturz der Serumlip. d. Thyroxin. Klin. Ws. **1933**, II, 1933. — 193) ***G. dell Acqua, W. Strauss,*** Sturz der Serumlip. d. Thyroxin. Klin. Ws. **1933**, II, 1935. — 194) ***J. Bauer, L. Feil,*** Sturz der Serumlip. d. Thyroxin. Wiener Med. Ws. **1934**, I, 566. BPh **80**, 512. — 194a) ***M. H. Hoffmann,*** Eff. of thyroxin . . . on serum lipase. Arch. of int. Med. **54**, 427 (1934). BPh **83**, 605. — 195) ***P. Stefanutti,*** Serumlip. im Histaminschock. Bioch. Zs. **228**, 421 (1930). — 196) ***R. Schwerdt,*** Lip. Geh. d. Kaninchenblutes etc. Diss. Göttingen 1931; BPh **66**, 639. — 196a) ***A. Nadel,*** Hautkrankh. und Serumlip. Arch. für Derm. **170**, 397 (1934); BPh **84**, 465. — 197) ***M. Dörle, H. v. Weiss,*** Fettspalt. Verm. und Cholest. Spiegel etc. Bioch. Zs. **167**, 395 (1926). — 198) ***Sh. Terashima,*** Tributyrinase der Lymphe. Proc. Imp. Akad. Tokyo **6**, 179, 181 (1930). — 199) ***A. Kálló,*** Lip. Geh. der Lymphe des D. thor. Zs. exp. Med. **86**, 848 (1933). — 200) ***R. Tsuji,*** Blutesterase. Arch. ges. Phys. (Pflüger) **229**, 344 (1932). S.A.

Cerebrospinalflüssigkeit: in der Norm fast stets frei von Lipase; Zunahme bei organischen Hirnerkrankungen mit meningealen Veränderungen (HILLER **201**)), aber abhängig vom Zellgehalt des L. cer.; GOZZANO **202**) fand keine zahlenmäßigen Beziehungen zu irgendwelchen Krankheitszuständen. An Leichenmaterial Zunahme nach Infektionskrankheiten, Abnahme uach Kachexien, etc. (BACH l. c. 162).

Kammerwasser des Auges: IKEBATA **203**).

Blutkörper, Leucocyten, lymphoide Zellen. Alle diese Zellen enthalten L. und geben sie auch an die Umwelt ab. Beide Arten weisse BK. enthalten reichlich L. Betr. Erythrocyten liegen Befunde vor in den Arbeiten RONA's (§ 266a) und bei BROCKMEYER **204**). Die Lipase soll von der des Serums unabhängig sein, d. h. ihre Mengen zu einander. Bei Polycythaemie vermehrt, bei Anaemien vermindert (BAZILEVIČ **205**)).

Was die Leukocyten anlangt, so hat es sich immer hauptsächlich um die Lymphocyten gehandelt, deren lipatische Wirkung unbestritten als energisch angesehen wurde. Dagegen blieb es lange zweifelhaft, ob auch die polymorphkernigen Leukocyten L. enthalten, was insbesondere BERGEL stets bestritten hat (H.W. § 279, *l. c. 272, 273*) und **206**), **207**). Gegen die früheren Befunde an Eiter (NEES u. a.) war der Einwand möglich, daß hier nicht die Zellen, sondern die Bakterien die L. abgegeben haben; entschieden wurde die Frage erst von FLEISCHMANN **208**), der in sterilem Eiter L. nachwies.

Die L. der weissen Blutzellen ist in allen ihren Eigenschaften—entgegen OHYAMA **209**) — eine ausgesprochene „Lipase", der Pankreasl. in Wirkung auf Fette, auf Aktivierung etc. sehr ähnlich (**210**). Eine biologische Verwandtschaft wird von WILLSTÄTTER c. s. (l. c. 92, § 275) in dem Sinne angenommen, daß die Pankreasl. selbst z. T. aus aufgenommenen und zerfallenen Leukocyten stammt.

Lymphocyten. Die Tatsache, daß die Lymphocyten reichlich Lipase enthalten, hat zu der Annahme geführt, daß sie ganz besonders im Kampf gegen die Tuberkulose wichtig sind (BERGEL), da sie durch diese Lipase das Wachs der Bazillen auflösen und diese weniger widerstandsfähig machen sollen (§ 269), und daß die dabei mitwirkende Serumlipase (§ 275) aus den Lymphocyten stammt. Diese ganze Lymphocytentheorie ist von ASCHOFF **211**) abgelehnt worden. Sie kommt aber nicht zur Ruhe (Neuere Zusammenfassung bei BERGEL **206**)). So bringt GEGETSCHKORI **212**) diese Lymphocytose mit reichlichem Vorkommen von Serolipase zusammen; solche Fälle produktiver Formen zeigen starke Abwehrkräfte (PIRQUETsche Reaktion) und gutartigen Verlauf; Mangel an Lymphocyten und geringe Lipasenwirkung (exsudative Formen) sind bösartiger. Ähnlich AKSJANZEW **213**) allgemeiner für alle Prozesse, die mit Mobilmachung der Lymphocyten verlaufen, mit deren Zerfall und Neubildung der

---

201) ***F. Hiller,*** Bez. der degen. Veränd. des ZNS zu . . . Enz. Zs. ges. Neur. **109,** 263 (1927). — 202) ***M. Gozzano,*** Lip. del liqu. cefalorach. Boll. Soc. Ital. Biol. **9,** 170 (1934). BPh **82,** 130. — 203) ***T. Ikebata,*** Über die Zusammensetzung des Kammerwassers. Bioch. Zs. **182,** 236 (1927). — 204) ***J. Brockmeyer,*** Wirk. des Cocains etc. auf Organlip. Klin. Ws. **3,** 1526 (1924). — 205) ***J. Basilevič,*** Erythroc.-Lip. Ter. Arch. **95** (1930) (russ.) BPh **56,** 94. — 206) ***S. Bergel,*** Morphol. und Funkt. der Lymphocyten. Arch. exp. Zellf. **3,** 23 (1927). — 207) ***S. Bergel,*** Lymphocytenfunktion. Arch. Path. (VIRCHOW) **266,** 820 (1927). — 208) ***W. Fleischmann,*** Vork. von Lip. in polymorphk. Leucoc. Bioch. Zs. **200,** 25 (1928). — 209) ***S. Ohyama,*** Et. bioch. de l'act. des lymphoc. Sci. Rep. Inst. Inf. Dis. **2,** 547, **3,** 173. BPh **30,** 483, **36,** 172. — 210) ***M. Shoda,*** Leucoc.-Lip. Okay. Ikad. Zasshi **1926,** 744. BPh **38,** 300. — 211) ***L. Aschoff, Kamiya,*** Lipoidspalt. Funkt. der Lymphocyten. D. Med. Ws. **1922,** 794. — 212) ***N. Gegetschkori,*** Lipol. Ferm. des Blutes etc. Zs. Tbk. **48,** 460 (1927). — 213) ***M. J. Aksjanzew,*** Fermentocytäre Reaktion des Organ. Zs. Immun. **55,** 423 (1928).

Gehalt an L. im Serum zusammenhängt. TAKEBAYASHI 214) fand L. vermehrt bei tuberc. Eiter (und tbc. Granulationsgewebe) gegenüber entzündlichen, IMOKAWA 215) das Gegenteil.

§ 277. **Sekrete, Exkrete. Harn** enthält in der Norm keine Lipase, beim Kaninchen nur unregelmäßig geringe Mengen (TERASHIMA, l. c. 198). BLOCH 216) fand stets geringe Mengen. Bei Tuberkulose, etwas stärker bei Nierentuberkulose erhöht (YASUDA 217).

Die Harnlipase kann natürlich ebenso wie die Blutlipase verschiedener Herkunft sein, z. T. stammt sie wohl auch direkt aus der Niere; denn BLOCH 216) fand im Harn chininfeste Lipase, also weder aus Pankreas, noch aus Blut stammend. Diese Lipase ist vermehrt bei Nieren- und Lebererkrankungen; bei letzterer findet sich auch Serumlipase, ebenso bei entzündlichen Nierenaffektionen.

Galle. MORALDI 218) fand L. in der Galle von Haustieren, am wirksamsten beim Schaf. Beim Menschen in der Blasengalle nicht gefunden (ALLODI 219)).

Faeces. In Haustierfaeces hat KRYZWANEK 220) L. nachgewiesen, am meisten beim Schwein.

Milch. Die alte Streitfrage, ob außer Frauenmilch (DAVIDSOHN *l. c. 243*) auch andere Tiermilchen eine genuine L. enthalten, ist immer noch nicht völlig geklärt. (Zus. Lit. RICE 221)). Es scheint aber darauf hinauszulaufen, daß jede Milch geringe Mengen enthält, die Frauenmilch größere, daß aber in allen Fällen die L. der völlig frischen Milch inaktiv ist, und dies gilt auch für die Frauenmilch (s. u.). Es scheint sich also nur um Gradunterschiede in der Menge und in der Aktivierbarkeit zu handeln.

Dagegen spricht vieles dafür, daß die L. der Frauenmilch qualitativ ein ganz anderes Ferment ist, als die bisher näher bekannten Tiermilchfermente. Diese L. — Kuhmilch als Hauptbeispiel — hat nach VIRTANEN 222) alle Eigenschaften der Serumlipase (wirkt kaum auf echte Fette) und ist wahrscheinlich überhaupt nichts anderes als ein aus dem Blut übergetretenes, also accessorisches Ferment. Die Frauenmilchlipase ist dagegen anscheinend ein wahrhaftes Sekretionsprodukt der Milchdrüse. Aus den Colostrumkörperchen stammt sie nicht, vielleicht ist sie aber in ähnlicher Beziehung wie die Pankreaslipase ein Produkt der Leucocyten. Dafür sprechen ihre Eigenschaften: sie ist viel mehr „Lipase" als die der Tiermilchen, nähert sich in der Wirkung auf echte Fette (Milchfett) stark der Pankreaslipase (LICHTENBERG 223), und unterscheidet sich von der Tiermilchl. durch ihre Resistenz gegen Atoxyl und Chinin (GOTTSTEIN 224), BEUMER 225), LUCCA 226)), was auf irgendwelche Verwandtschaft mit der Hautlipase oder der Fettgewebsl. deutet. Der Pankreasl. ähnelt sie auch durch ihre Aktivirbarkeit durch Gallensalze, jedoch sind die Aktivirungserscheinungen hier von besonderer Art, auf die wir unten zurückkommen.

---

214) ***H. Takebayashi,*** Lip. in den Geweben etc. Beitr. Klin. Tbk. **67,** 748 (1927). — 215) ***T. Imokawa,*** (Lipase im tbc. Eiter) Kaigun Gunik. Z. (jap.) **16,** 111 (1927). cit. n. Yasuda (l. c. 217). — 216) ***E. Bloch,*** Urinlipase. Klin. Ws. **1928,** 1318. Zs. exp. Med. **85,** 416. — 217) ***R. Yasuda,*** Lip. Geh. des Harns etc. Tohoku Jl. exp. Med. **20,** 265 (1933). — 218) ***M. Moraldi,*** Pot. lipolit. della bile. Riv. di Biol. **13,** 116 (1931). BPh **68,** 121. — 219) ***A. Allodi c. s.,*** Studio della lip. nel succo duod. Giorn. Acc. Med. Torino **94,** 134 (1931). BPh **65,** 469. — 220) ***Fr. W. Krzywanek, Bedi-i-Schakir,*** Fermentgeh. der Haustierfäces. Bioch. Zs. **220,** 342 (1930). — 221) ***Fr. E. Rice, A. L. Markley,*** Pres. of lip. in milk etc. Jl. of Dairy Sci. **1922,** 64. — 222) ***A. I. Virtanen,*** Spalt. u. Synth. der Ester etc. Zs. phys. Chem. **137,** 1 (1924). — 223) ***H. Lichtenberg,*** Z.K. der Magenlip. Zs. Kind. **54,** 732 (1933). — 224) ***W. Gottstein,*** Frauenmilchlipase. Jb. Kindhlk. **106,** 97 (1924). — 225) ***H. Beumer,*** Frauenmilchlip. Zs. Kind. **38,** 593 (1924). — 226) ***A. Lucca,*** Lip. delle latte. Riv. Clin. Pediatr. **29,** 1056 (1931). BPh **65,** 299.

Bei den Tiermilchen, bei denen also die Milchlipase wahrscheinlich nur Seruml. ist und keine physiologische Rolle spielt, ist es unwesentlich, ob man gar keine aktive L. findet, wie ältere Autoren (PALMER, *l. c. 253*), und BEUMER **225**)) (Kuh, Ziege, Kaninchen, Pferd); oder geringe Mengen wie VIRTANEN **222**), NAIR **227**) u. a.; oder nur bei Milchfehlern (PALMER, *l. c. 254*) resp. bei altmelken Kühen (KOESTLER **228**)); oder ob man endlich grundsätzlich diese kleinen Wirkungen auf Bakterien beziehen will (H.W. S. 494). Jedenfalls sind auch die geringen Mengen Milchlipase noch inaktivirt, anscheinend durch Adsorption an das Caseinogen, man kann aber durch verschiedene Eingriffe diese Adsorption lockern und das Enzym freimachen. Als solche gelten die Labung (DEMUTH **229**)), die das Caseinogen wegschafft; die Homogenisirung, welche die Oberfläche der Fettkügelchen vervielfacht und dadurch die Adsorption des Enzyms zugunsten dieses Substrates verschiebt (DORNER **230**)); und endlich Schütteln (BEHRENDT **231**)).

Mit diesen letzten Angaben sind wir nun aber schon auf das Gebiet der **Frauenmilchlipase** übergegangen; denn die Versuche von DEMUTH und BEHRENDT sind hauptsächlich zum Zwecke der Aufklärung unternommen werden, warum denn die so wirksame L. der Frauenmilch niemals in der ruhig stehenden Milch selbst lipolytisch wirkt, also gänzlich inaktiv ist, während sie im Magen aktivirt wird und noch vor der Wirkung der eigentlichen Magenlipase und mit viel größerer Bedeutung als diese (§ 273) die Fettspaltung im Säuglingsmagen katalysiert.

So kamen denn die Autoren zu der Vorstellung, daß auch die Frauenmilchl. durch Adsorption an die Milchkolloide inaktivirt ist und durch Lösung dieser Adsorption einfach freigesetzt wird. Diese Erklärung mag für die unspezifische L. der Tiermilchen hinreichen, für die spezielle L. der Frauenmilch genügt sie nach den eingehenden Versuchen von FREUDENBERG **232**), **233**) nicht. Er zeigte, daß die kolloidchemische Erklärung nicht ausreicht. Insbesondere hat die Labung garnichts mit der Aktivirung zu tun, denn wenn man Kälberlab (bei ph = 6) verwendet, wird zwar die Frauenmilch tadellos koagulirt, aber der Aktivirungseffekt bleibt aus. Demgegenüber aktivirt Magensaft des Säuglings, der weniger gut labt, im vollen Umfange. Sowohl die Labung wie das Schütteln wirken an sich zwar etwas, aber nur dadurch, daß sie die vorhandenen geringen Mengen aktiver L. in intime Berührung mit den Fettkügelchen bringen, also ebenso wie bei den Tiermilchen.

Nach FREUDENBERG kommt man also mit diesen Erklärungen nicht aus; es liegt eine chemische Aktivirung der Frauenmilchl. vor. Es gibt einen doppelten Mechanismus dieser Aktivirung. Erstens wird die an sich völlig unwirksame L. durch Gallensalze aktivirt (Näh. § 267), und zweitens tritt ein eigener, im Magensaft vorhandener Aktivator, die **Lipokinase** auf.

Dieser Aktivator findet sich im Magensaft des Säuglings, aber erst einige Stunden nach der Mahlzeit; fehlt bei allen Tieren, außer Hund und Katze, in der Magenschleimhaut, fehlt überall im Speichel und Darm. Aus Magenschleimhaut ist die Kinase mit Glycerin extrahirbar und beständig, sie kommt auch, aber nicht regelmäßig, bei älteren Kindern vor. Bei ph = 3 wird dieser Aktivirungsmechanismus durch Zerstörung der Kinase aufgehoben. Ältere Brustkinder mit normaler HCl-Sekretion haben also keine Fettverdauung im Magen mehr, sie schalten auf Eiweißverdauung um. Bei Dyspepsie kann die Kinase fehlen. Die Kinase ist thermolabil, unlöslich in Alkohol, nicht dialysabel, adsorbirbar an Cellulose. Die derart aktivirte

---

227) ***J. H. Nair***, Lipase in . . . milk. Ind. Eng. Chem. **22**, 42 (1930). — 228) ***G. Koestler c. s.***, Sekr. lipolyt. aktiver Milch. Landw. Jahrb. Schweiz, **1928**, 937. — 229) ***Fr. Demuth***, Milch- und Magenlip. Bioch. Zs. **150**, 392 (1924). — 230) ***W. Dorner, A. Widmer***, Ranciss. du lait etc. Lait **11**, 545 (1931). — 231) ***H. Behrendt***, Zustandek. der aktiven Magenacidität etc. Jb. Kind. [3] **56**, 115 (1924). — 232) ***E. Freudenberg***, Zur Verdau. Phys. des Säuglings. Zs. Kind. **43**, 437, **46**, 170 (1927/8), **55**, 716 (1933). S.A. — 233) ***E. Freudenberg***, Bez. zw. Spalt. u. Oxyd. der Fette. Klin. Ws. **1934**, 723. S.A.

Milchlipase ist stark wirksam auf Fettsäuren, spaltet in 2 h das Frauenmilchfett zu 30—40 %, in Zusammenarbeit mit Darmlipase fast quantitativ.

Es sei gleich hier noch vermerkt, daß die Milchl. die Acidität des Mageninhaltes (ph = 5) ohne weiteres erträgt und im Darm — vor Allem durch Galle — wieder reaktivirt werden kann.

Die Deutung dieser Befunde ist bisher ebenso schwierig, wie alle Fragen, die mit der Existenz eines „Zymogens" bei der Lipase verbunden sind (§ 267), FREUDENBERG steht auf dem Standpunkt, daß es eine wahrhafte „Prolipase" gibt. Sie haftet nicht am Caseinogen, sondern an den Globulinen, und kann von diesen in inaktivem Zustande getrennt und dann aktivirt werden. Gallensalze und Kinase wirken jedes für sich voll aktivirend, eine Verstärkung tritt nicht ein.

Das spräche also tatsächlich für ein Zymogen, im strikten Gegensatz zu den Feststellungen von WILLSTÄTTER. Es scheint sich aber doch auch hier nur um einen besonderen Fall der immer wieder beobachteten Verschiebungen im System der wesentlichen Begleitstoffe zu handeln. Dafür sprechen neuere Beobachtungen von FREUDENBERG **233)**, daß die „Kinase" ersetzt werden kann durch Oxy- und Ketosäuren, sowie vor allem durch spontan — beim Schütteln oder Aufbewahren von Milch — entstehende Oxydationsprodukte der Fettsäuren (Acetessigsäure, β-Oxybuttersäure etc.; auch Aceton). Das spricht natürlich mehr für eine Befreiung der Lipase aus hemmenden Adsorptionen. Die weitere Verfolgung dieser hochinteressanten Befunde wird vielleicht einmal endgiltig Licht über die verwickelten Verhältnisse bei der Aktivirung der Lipasen überhaupt bringen.

Speichel. Auf die L. im Speichel, die vielleicht eine Funktion bei der Reinhaltung des Mundes hat, ist man erst neuerdings aufmerksam geworden.

SCHEER **234)**, KATZENSTEIN **235)** (Mensch), KOLDAJEW **236)** (Hund) fanden sie reichlicher im Parotisspeichel, PELUFFO **237)** im Submaxillarisspeichel; ph-Opt. 7,0—7,6, Na-Oleat + Ca aktiviren. Wirksam bei ph 6—9, NaF hemmt (PELUFFO), Atoxyl nicht. Sp. enthält mehr L. als Serum (DA RIN **238)**). GEJMOVSKY **239)** fand L. bei Hund, Pferd, Ziege, Kuh. Beim Hund soll sie im reinen Parotissekret fehlen (KATZENSTEIN **235)**), wurde aber in Fisteln gefunden (SAMYTSCHKINA **240)**); KOEBNER **241)** fand L. bei Herbivoren (Opt. ph alkalisch, 8—8,5) und Schildkröte.

Beim Menschen nimmt der Gehalt umgekehrt zu der Menge des Speichels zu oder ab (KATZENSTEIN), unabhängig vom Lebensalter (KOEBNER). Fettdiät hat beim Hund keinen Einfluß **(240)**.

Während der Gravidität dauernde Zunahme (KOEBNER). Bei akuten Krankheiten vermindert, vermehrt bei Duodenalulcus, Cholecystitis, Carcinom (Leber, Magen) (DA RIN **238)**). Bei Diabetes vermindert, Leberkrankheiten ohne Zusammenhang (KOEBNER). Pilocarpin hat keinen Einfluß (DA RIN **238)**).

Im **Sputum** fand PUDER **242)** bei Tuberkulösen Zunahme mit der Schwere der Erkrankung, während gleichzeitig die Serumlipase abnimmt. Im Zusammenhang mit den Theorien über die Bedeutung der L. für die Bekämpfung der Tbc. Bazillen (vgl. § 269) stellt er die Vermutung auf, daß die Seruml. durch die Ausscheidung im Sputum sozusagen verloren geht, je mehr (oder so daß?) der Krankheitsprozess fortschreitet. Ein neues Wort für diese neue „Theorie" darf nicht fehlen: „Lipasorrhoe".

---

234) ***K. Scheer,*** Lip. im Speichel. Klin. Ws. **7,** 163 (1928). — 235) ***M. Katzenstein,*** Speichellip. Zs. exp. Med. **69,** 179 (1929). — 236) ***B. Koldajeff c. s.,*** Lipol. Wirk. d. Speichels. Bioch. Zs. **212,** 53 (1929). — 237) ***A. Peluffo,*** Act. lipas. de la salive. Soc. Biol. **100,** 115 (1929). Riv. Soc. Argent. Biol. **4,** 1012 (1928). BPh **50,** 113; **51,** 79. — 238) ***O. da Rin,*** Az. lipol. d. saliva. Clin. Med. Ital. **61,** 340 (1930). BPh **59,** 646. — 239) ***V. Gejmovský,*** Ferm. im Speichel. Biol. Listy **14,** 184 (1929). BPh **52,** 259. — 240) ***K. S. Samytschkina,*** Einfl. versch. Nahr. auf . . . Speichelsekr. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **230,** 680 (1932). — 241) ***H. Koebner,*** Unters. über Speichellip. Zs. exp. Med. **76,** 792 (1931). — 242) ***S. Puder,*** Lipolyt. Ferm. Geh. des Sputum etc. Beitr. Klin. Tbk. **79,** 98 (1931). BPh **67,** 400.

5) Lipasen der Gewebe.

§ 278. Lipasen finden sich in allen Organen, mit Ausnahme (vielleicht) des Muskels; vgl. a. H.W. §§ 212 ff. Gewebsschnitte eignen sich aus methodischen Gründen nicht besonders zur Untersuchung (Rona 243)). Alle Organlipasen gehören zum Typus „Esterase", Fettspaltung wird meist vermißt. Nur im Fettgewebe (Hund) hat Quagliariello **244)** eine echte „Lipase" nachgewiesen, die auch sonst der Pankreaslip. ähnlich ist (ph, Hemmung, Aktivirung); auch die Lungenl. soll Lipase sein (Rordorf, l. c. 254); endlich nähert sich die L. der Haut den „sekretorischen" L.

Über den relativen Gehalt liegen viele ältere Arbeiten vor, die modernen Anforderungen nicht genügen. Neuere Angaben bei Noyes u. Falk **245**), **246**). Absteigende Werte (Kaninchen): Leber (Milz), Lunge, Hoden, Niere, Gehirn, Muskel. Weitere Angaben nach den Organen geordnet, Reihenfolge meist verschieden, je nach Substrat, als Beispiel: Leber Ratte>Kaninchen für alle Ester; Ratte>Rind für Phenylacetat, 2 Butyrate, umgekehrt für alle anderen Ester; Rind>Kaninchen überall. Nach Virtanen **246a)** enthält die Leber bei Kaninchen etwa viermal so viel wie Pankreas, achtmal so viel wie Niere, bei *Cavia* 6 mal so viel wie Niere, siebenmal wie Lunge.

Neben Niere und Leber scheint die Placenta das lipasereichste Organ zu sein (s. u.). Rattenorgane haben die stärkste, Menschenorgane die schwächste lipatische Wirkung (Falk). Unterschiede zwischen fetalen, jungen und alten Ratten beim Aufbewahren der Organe etc. **(247)**

Mit exakter Methodik fanden Rona u. Lasnitzki **243)** bei der Ratte an Gewebsschnitten Leber und Niere 6—7 mal stärker wirksam als Milz und Tumoren. Leber und Niere haben einen mg/Stunden-Quotient von 2,1—4,3, resp. 2, Milz und Carcinom von 0,88 resp. 0,9 Mikromol Buttersäure; Placenta nach Anselmino (l. c. 261) 1,1.

Leberlipase. Weitaus am besten untersucht ist die Leberlipase, weil an ihr die besonderen Eigenschaften und Wirkungen der typischen „Esterasen" quantitativ studiert worden sind. Sie ist auch die einzige in stark gereinigtem Zustande bekannte Organlipase: Kraut und Rubenbauer konnten eine 130fache Wirkung ihrer besten Präparate gegenüber getrockneter Leber erzielen (Esterase-Wert 114). Mit weiteren Reinigungsmethoden erzielten Bamann und Kraut noch wirksamere Präparate (§ 262). Bei Feten (ab 4. Monat, **(248)**) und Kindern geringerer Lipasegehalt, aber gleiche stereochemische Spezifität (Ammon u. Geisler, Bamann § 269).

Wirkungsverschiedenheiten nach biologischen Bedingungen. Isolierte Leber gibt auf Reiz schwacher Sekretinlösung L. ab; auf Pilocarpin reagiert sie mit Schwankungen (Prewitt, l. c. 93, 94). Abderhalden **249)** fand bei Gänsen nach Mästung die L. der Leber vermehrt, berechnet auf gleichen N-Gehalt.

Bei Sauerstoffmangel (Unterdruckkammer) mit Leberverfettung (*Cavia*) Aktivitätsminderung (Malowan, l. c. 173). Bei Hyperthyreoidismus, resp. Injektion von Thyroxin starke Minderung (Bauer, l. c. 194). Vergiftungen: Injektion von Fluorid (NaF) bei Kaninchen setzt die L. um 70 % herab (Leake c. s. **250**)).

---

243) ***P. Rona, A. Lasnitzki,*** Gewebslipasen. Bioch. Zs. **178**, 207 (1926). — 244) ***G. Quagliariello, G. Scoz,*** Az. lipol. del tess. adip. Boll. Soc. ital. Biol. **5**, 1119. BPh **60**, 791; Arch. des sci. biol. **17**, 513 (1932) Mem. Acc. Ital. Mat. 4, 17 (1933). S.A. — 245) ***H. M. Noyes, K. G. Falk,*** Comp. lipase actions of diff. rabbit tissues. Jl. of Biol. Chem. **62**, 687 (1924). — 246) ***K. G. Falk c. s.,*** A comp. study of the char. lipase act. of the tissues of diff. animals. Jl. of Biol. Chem. **62**, 697 (1924). — 246a) ***A. I. Virtanen, P. Suomalainen,*** Lip. im Tierorganismus. Zs. phys. Chem. **219**, 1 (1933). — 247) ***H. M. Noyes, K. G. Falk,*** Changes in ester hydrol. action etc. Jl. of Biol. Chem. **72**, 449, 475 (1927). — 248) ***T. Tachibana,*** Lip. in liver. Jap. Jl. Obstetr. **11**, 220 (1928); BPh **51**, 483. — 249) ***E. Abderhalden,*** Ferm. Geh. der Leber. Fermentforsch. **8**, 195 (1925). — 250) ***Ch. D. Leake, A. S. Loevenhart c. s.,*** Inhib. eff. of NaF on hepatic lip. Amer. Jl. Phys. **90**, 426 (1929) (Kongressber.). — 251) ***K. W. Clauberg,*** Fettleber bei Lungenschwindsucht etc. Arch. Path. (Virchow) **253**, 452 (1924). BPh **80**, 576.

Krankheiten: bei Lungentuberkulose vermindert (CLAUBERG 251)), ebenso bei exper. Tbc. (*Cavia*) (l. c. 168a); beim tuberkulösen Schwein dagegen stark vermehrt, bei solchen Tieren in gutem Ernährungszustande mehr als bei schlechtem, aber auch bei schlechtem noch immer weit mehr als normal (GHIRON 252)). Die Leber des tuberkulösen Schweins soll im Gegensatz zur normalen eine echte „Lipase" enthalten, die Olivenöl spaltet (GHIRON), sowie auch das Wachs der Tbc-Bazillen (§ 268).

Über angeblichen Übertritt der chininfesten Leberlipase ins Blut bei verschiedenartigen Störungen s. §§ 275/6. Diese ganze Sache ist nicht sehr wahrscheinlich; vermutlich handelt es sich nur um Aktivierung der Serumlipase durch übergetretene gallensaure Salze.

Über sonstige Organlipasen sind folgende neuere Arbeiten zu erwähnen, in ungefährer Anlehnung an die Wirksamkeit der einzelnen Organe. Über Nachweis in Gewebsschnitten s. RONA (l. c. 243).

Lunge. Schon im 4. Fetalmonat nachweisbar (TACHIBANA 253)). Nach RORDORF 254) ist es eine wahre Lipase, die Fette spaltet, und ähnelt der L. des Fettgewebes: sie wird durch Gallensalze aktivirt, durch NaF, Atoxyl, Chinin gehemmt.

In 1,5 gr Trockenpulver 1 L.E. Diese Wirkung auf Fette wird mit dem Problem der Lipodihärese in den Lungen zusammengebracht (§ 271a); da eine „Oxydase" nicht gefunden wird, wird die ROGERsche Theorie abgelehnt, die ja im übrigen sich längst nicht mehr auf die Lunge beschränkt. Nach FALK 254a) hat die L. der Lunge andere Eigenschaften als die anderer Gewebe; sie hat den „embryonalen" Typus.

Bei mit Tbc. infizirten Tieren nimmt die L. stark bis zum Verschwinden ab (255); nach VIRTANEN (*Cavia*) (l. c. 168a) und RORDORF 256) (Kaninchen) sind keine Unterschiede aufzufinden. Alledem gegenüber behauptet NAKAMURA 257), daß Lunge keine Lipase enthält.

Niere. Schon im 4. Fetalmonat nachweisbar (TACHIBANA 258)); genauere Untersuchung der Nierenlipase TANAKA 259)).

Placenta enthält stets L., die chinin- und atoxylfest ist (CLAUSER 260)), resp. wenig empfindlich (ANSELMINO 261)). Sie steht in ihrer Wirksamkeit nur wenig hinter Leber und Niere zurück, mehr als Milz, Tumoren. Zunahme bis Mitte der Gravidität, dann Abnahme. Placentaschnitte 20—50 mal wirksamer, aber nach 1 h ohne Wirkung (ANSELMINO 261)). Spaltung von reinen Fetten nicht vorhanden (MACCHIARULO 262)). ABE 263) fand ebenfalls Vermehrung im 4.—6. Monat.

Gehirn. TAKASAKA 264) fand wenig L., resistent gegen Atoxyl und Chinin, HILLER (l. c. 201) ebenfalls wenig L.; Cholesterase wurde von PIGHINI 265) ganz vermißt. Graue Substanz stärker wirksam auf Tributyrin als weisse, Wirkung überhaupt schwach. Die Lipase ist chininresistent (GOZZANO 266)).

252) ***M. Ghiron,*** Fettspalt. Eigensch. der Leber etc. Fermentforsch. **14**, 182 (1934). — 253) ***T. Tachibana,*** Pulmon. lip. in human fetus. Jap. Jl. Obst. **12**, 82 (1929). BPh **53**, 115. — 254) ***R. Rordorf,*** Metabol. dei lipidi nel polmone. Boll. Soc. ital. Biol. **9**, 169, Arch. di Sci. Biol. **20**, H. 3 (1934). S.A. — 254a) ***K. G. Falk, Gr. Mac. Guire,*** Lip. Wirk. von Gew. rachit. Ratten. Jl. of biol. Chem. **108**, 61, Ch. Cbl. **1935**, I, 2549. — 255) ***D. Kanócz,*** Vers. mit Lungenlip. Zs. Tbk. **63**, 113 (1931). — 256) ***R. Rordorf,*** Attiv. lipol. del polmone etc. Boll. Soc. ital. Biol. **9**, H. 8; Arch. di Sci. Biol. **20**, H. 5 (1934). S.A. — 257) ***Y. Nakamura,*** Funkt. der Lunge etc. (jap.) BPh **46**, 221. — 258) ***T. Tachibana,*** Lip. in kidney of human fetus. Jap. Jl. Obstetr. **12**, 33 (1929); BPh **50**, 798. — 259) ***T. Tanaka,*** Einfl. versch. Ionen auf Nierenlip. (jap.) Autoref. BPh **63**, 674. — 260) ***F. Clauser,*** Esterasi plac. Riv. ital. ginec. **4**, 115 (1926). BPh **36**, 321. — 261) ***K. J. Anselmino, F. Hoffmann,*** Über den Lipasegeh. der Placenta. Arch. für Gynäkol. **138**, 202 (1929). S.A. — 262) ***O. Macchiarulo,*** Pot. lipol. d. plac. Atti Soc. ital. Ostetr. **27**, 661. BPh **58**, 149. — 263) ***M. Abe,*** Plac. ferm. I. Lipase. Jap. Jl. Obst. **13**, 301 (1930). BPh **59**, 318. — 264) ***T. Takasaka,*** Über den Fermentgeh. des menschl. Gehirns. Bioch. Zs. **184**, 390 (1927). — 265) ***G. Pighini, E. Mazza,*** Ric. s. colester. nella sost. nerv. Bioch. Ter. sper. **12**, 123 (1926). BPh **37**, 416. — 266) ***M. Gozzano,*** Lip. del tess. nerv. Boll. Soc. ital. Biol. **9**, 167 (1934). BPh **81**, 519.

Hühnerei: im frischen Ei deutliche Tributyrinspaltung, stärker als die von Methylbutyrat (Gelbei 240 Einh. gegen 125 Einh.). Im bebrüteten Hühnerei regelmäßige Zunahme, in 20 Tagen auf das 100fache (ENGELHARDT **267**)), nach REMOTTI **268**) dagegen bis zu einem Maximum nach 2 Wochen. Dabei vermehrt sich die „echte" Lipase schneller als das Methylbutyrat spaltende Enzym. Von der zweiten Hälfte an vorwiegend im Embryo, am reichsten ist die Membran des Dottersackes, 30 mal so viel wie frisches Eigelb. Allantois wenig, Fruchtwasser Null. Esterase mehr im Embryo selbst, wohl hauptsächlich in der Leber (AMMON c. s. **269**)).

Im Eileiter (Tuba Fallopii) bei der Frau TACHIBANA **270**) als Sekretionsprodukt der Schleimhaut.

Endokrine Organe. Nebenniere. Während TSCHEBOKSAROW **271**) besondere (gegen Chloralhydrat empfindliche) L. gefunden hat (§ 266), hat sie PARFENTJEFF **272**) überhaupt vermißt; jedoch hat JORNS (l. c. 153) wieder das Vorhandensein dieser besonderen Lipase bestätigt. Phosphatidspaltung in der Nebennieren-Rinde s. § 280. Über L. der **Schilddrüse** und ihren vermutlichen Übergang ins Blut s. FIESSINGER (l. c. 90) (§ 275). Tonsillen-L. stammt wahrscheinlich aus ausgewanderten Lymphocyten (MOTAI **274**)).

In der **Milchdrüse** ist der Lipasegehalt sehr klein (KLEINER **275**)). VIRTANEN **276**) fand eine geringfügige Spaltung; besser verläuft die Synthese, aber nur bei ph unter 5. Auch MICHLIN **277**) erhielt mit Acetontrockenpräparaten Synthesen bis zu ca. 60 %. LAXA **278**) nimmt die Existenz einer L. an, weil das Fett der Drüse reichlich freie Fettsäuren enthält (wahrscheinlich aus Phosphatiden; die Drüse enthält reichlich, die Milch wenig Phosphatide).

Im großen Netz (Hund) GOLDBERG **297**). In der Bauchhöhle LEJHANEC **280**). **Fettgewebe**: QUAGLIARIELLO **281**) fand Gehalt $^1/_{100}$ von Pankreas, 25fach von Leber. 3—4,5 gr Trockenpulver = 1 L.E. Verminderung bei Fettsucht und in Lipomen DELL ACQUA **282**), nach Thyroxininjektion GHIRARDI **283**). Esteratische und lipatische Wirkung bei verschiedenen Tieren verschieden, Huhn und Truthahn mehr Lipase, Mensch, Schaf, Gans mehr Esterase (HEPBURN **284**)).

Haut. Lipase in der obersten Hautschicht und im Unterhautgewebe; angereichert ist sie in der Haut der Genitalgegend. Sie ist resistent gegen Chinin und Atoxyl (**285**, **286**). Tierische Haut führt reichlicher L. als menschliche. Bestrahlung mit natürlichem

---

267) ***V. Engelhardt, R. Vaehner,*** Ferm. Bild. im bebrüt. Ei. Z. eksp. biol. **5**, 335 (1927) (Russ.). BPh **48**, 711. — 268) ***E. Remotti,*** Assunz. delle risorb. grasse dur. la svil. embr. Ric. Morf. **10**, 1 (1930). BPh **60**, 251. — 269) ***R. Ammon, E. Schütte,*** Verh. von Enz. im Hühnerei, Bioch. Zs. **275**, 216 (1935). S.A. — 270) ***T. Tachibana,*** Ferm. in the inner genit. of women. Jap. Jl. Obstetr. **12**, 150 (1929); BPh **54**, 108. — 271) ***M. Tscheboksarow, S. J. Malkin,*** Nebennierenlip. Klin. Ws. **1927**, 1472. — 272) ***J. Parfentjeff, B. Sokolow,*** Puiss. lipol. des gl. surrén. Soc. Biol. **107**, 114; BPh **62**, 611. — 274) ***T. Motai,*** Lip. d. Tonsillen, Nagoya Jl. Med. Sci. **3**, 51. BPh **53**, 267. — 275) ***J. S. Kleiner, H. Tauber,*** Enz. of mamm. gland. Jl. of Biol. Chem. **99**, 241 (1932). — 276) ***A. I. Virtanen,*** Die Spaltg. u. Synth. der Ester durch Lip. der Milchdrüsen u. der Milch. Zs. phys. Chem. **137**, 1 (1924). — 277) ***D. Michlin c. s.,*** Synth. des Fettes der Milchdrüse. C. R. Ac. Sci. USSR. **2**, 573 (russ.). BPh **80**, 512. — 278) ***O. Laxa,*** Comp. chim. d. l. glande mamm. Lait **7**, 336 (1927). — 279) ***J. M. Goldberg,*** Netzferm. Bioch. Zs. **188**, 475 (1927). — 280) ***G. Lejhanec,*** Estérase periton. Soc. Biol. **113**, 1231. BPh **75**, 238, sowie tschech. ebd. 545. — 281) ***G. Quagliariello, G. Scoz,*** Esist. di una lip. nel. tess. adip. Arch. di Sci. Biol. **17**, 513 (1932). S.A. — 282) ***G. dell Acqua,*** Lip. Gehalt d. Fettgewebes. Zs. exp. Med. **71**, 245 (1930). — 283) ***G. E. Ghirardi,*** Pot. lipol. del tess. adip. Arch. di Sci. biol. **19**, 470 (1934). BPh **81**, 169. — 284) ***J. S. Hepburn, H. Mc. Duffy Moore,*** Rel. conc. of esterase and lip. in adip. tissue. Amer. Jl. Pharmac. **106**, 14 (1934). BPh **82**, 339. — 285) ***J. Wohlgemuth, Y. Yamasaki,*** Über die Ferm. der Haut. Bioch. Zs. **147**, 203 (1924). — 286) ***J. Wohlgemuth, E. Klopstock,*** Über die Verteil. der Ferm. in der Haut. Ebenda **153**, 487 (1924).

Licht oder Höhensonne führt zu einer geringen Abnahme, Röntgenstrahlen sind ohne Einfluß (287); weitere Untersuchung (288).

Tumoren. Im Kaninchen-Sarkom MIYAMA 289), gleich viel in aktiven und nekrotischen Teilen des Gewebes. Angaben bei NOYES und FALK 290): Mäusetumoren bestimmter Art sollen etwas stärker wirken als Flexner-Jobling bei Ratten; schnell wachsende weniger als langsam wachsende. Vergleich an 10 Estern von Ratten-, Mäuse-, Kückentumoren. Bildung von „Aktivator" bei Autolyse von Tumorsubstanz WATERMAN 291), vgl. § 267.

Granulationsgewebe. Tuberkulöses mehr als anderes. Auch tuberkulöser Eiter mehr als anderer (292). In Ovarialcysten stets L., in serösen mehr als in stark pseudomucinhaltigen (293).

Lipasen bei Wirbellosen. Die meisten Angaben sind nur kasuistisch, bestätigen neben anderen Enzymen eben auch die Lipase; vgl. Allgem. T. § 205; s. a. KRÜGER 294), 295). Die Mitteldarmdrüse der Mollusken („Jecur") ist dem Pankreas aequivalent, s. § 271. Bei Coelenteraten, Lamellibranchiern und *Strongylocentrotus* sollen extracelluläre L. fehlen (Lit. bei KRÜGER). Genauer untersucht sind z. B. — außer den Enzymen von *Helix,* ferner *Galleria melonella,* der Wachsmotte wegen der Tuberkelwachsfrage, § 268 — die Raupen des Seidenspinnern *Bombyx mori,* die allerdings nach SHINODA 296) nur wenig L. enthalten.

Nach YAMAFUGI 297) ist die Bombyxlipase (Blut) optimal wirksam bei ph 7,7, wenig empfindlich gegen Atoxyl und Chinin. Sie erreicht ihr Maximum beim Kokonspinnen, bei Hunger und Krankheit nimmt sie zu. Sie soll hier eine Rolle beim Abbau der Fette spielen.

Mollusken: Bei *Limax* (Kropfsaft) ph = 5,6 — 5,9 (GRAETZ 299)); Darmlipase von *Helix* (l.c. 5, 6). *Aplysia,* Kephalopoden: KRÜGER 300).

Crustaceen: Untersuchung der Magenlipase des Flußkrebses, *Potamobius astacus,* KRÜGER 298): opt. ph 5,7, Hemmung wie üblich durch Oleat + Ca, Giftempfindlichkeit s. § 266a. GRUZEWSKA 301) fand L. im Blut bei *Carcinus maenas, Cancer pagurus, Homarus, Palinum, Maja* u. a. — Bei *Homarus* fehlt sie während der Mauserung im Aug.—Sept. fast ganz. Soll angeblich nur Monobutyrin, nicht Tributyrin und Mono-acetin spalten (*Cancer, Homarus*). — Blutlipase fehlt auch bei *Astacus* (DAMBOVICEANU 302)).

Drosophila melanogaster zeigt steigende L.-Wirkung (ganzes Tier) mit zunehmendem Alter,

---

287) ***Ders., N. Sugihara,*** Unters. über den Fermentgeh. frischer Haut. Ebenda **163,** 260, (1926). — 288) ***Ders., Y. Nakamura,*** Verh. der Lip. in der Haut. Bioch. Zs. **175,** 216 (1926). — 289) ***K. Miyama,*** F. des Kaninchensarkoms, Sei-i-Kwai Med. Jl. **53,** H. 6 (1934). Ch. Cbl. **1935,** I, 1256. — 290) ***H. M. Noyes, K. G. Falk c. s.,*** Comp. lip. act. of human tumors. Jl. of cancer res. **9,** 105, 129 (1925). **10,** 422. BPh **32,** 818, **36,** 778, **43,** 602. — 291) ***N. Waterman,*** Lipaseaktivir. etc. Zs. Krebsf. **34,** 327 (1931). S.A. — 292) ***H. Takebayashi,*** Lip. in den Geweben etc. Beitr. Klin. Tbk. **67,** 748 (1927). BPh **44,** 822. — 293) ***T. Tachibana,*** Ferm. in cyst-fluid etc. Jap. Jl. Ostetr. **11,** 100 (1928). BPh **49,** 402. — 294) ***P. Krüger,*** Vergl. Fermentstoffw. niederer Tiere. Erg. Phys. **35,** 538 (1933). S.A. — 295) ***P. Krüger,*** Verdauungsdrüsen niederer Tiere; Verdau. u. Res. wirbelloser Tiere. Hb. Bioch. Erg. Werk Bd. II, Jena 1934. — 296) ***O. Shinoda,*** Dig. enz. of the silkworm. Jl. of Biochem. **11,** 345 (1930). — 297) ***K. Yamafugi,*** Enzyme von Bombyx mori. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **10,** 57 (1934). S.A. — 298) ***P. Krüger, E. Graetz,*** Lip. F. des Flußkrebses. Sitzber. Ges. naturforsch. Fr. Berlin **1927,** 48. Zool. Jb. Allg. Zool. **45,** 463 (1928). S.A. — 299) ***E. Graetz,*** Verdau. Ferm. im Kropfsaft einheim. Pulmonaten. Zs. phys. Chem. **180,** 305 (1929). — 300) ***P. Krüger,*** Verdau. Ferm. der Wirbellosen. Pr. Akad. Wiss. Berlin **26,** (1929). S.A. — 301) ***Z. Gruzewska c. s.,*** Lip.... dans le sang de qu. crustac. C. R. **195,** 278 (1932). Internat. Phys. Kongr. Rom. 1932. BPh **72,** 359. — 302) ***A. Damboviceanu,*** Comp. chim. du liqu. cavit. chez. les crustacées. Arch. Roum. Path. **5,** 239 (1932). BPh **72,** 43.

Abgeschlossen: 20. Mai 1935. Ber. Phys. 84, H. 7/8.

für verschiedene Abarten verschieden. Kurzlebige sind ärmer an L. (SEKLA 303)). Bei *Periplaneta americana* (Schabe) opt. ph = 8,0 (WIGGLESWORTH 304)); Darm von *Apis mellifica* l.c. 58.

Vermes: Polychaete *Sabella*, ph = 7,8 (NICOL 305)). Wirkt am stärksten auf Methylacetat (5,6 ccm NaOH), schwach auf Olivenöl (1,3), Lecithin (0,7 ccm). Untersuchung der Lipasen in Darm und Geweben von *Hirudo* und *Hämopis* 306). Bei letzterem reichlicher im Darm wegen stärkeren Stoffwechsels. Die Enzyme sind ähnlich: betonte Spaltung von Tributyrin, schwach von Olivenöl; opt. ph. 8,3. Giftwirkung auf die Enzyme bei *Hämopis* für Darm und Gewebe gleichartig, aber von der auf das Enzym von *Hirudo* verschieden. In der Qualle *Nebella spirans* HAUROWITZ 307). Butyrasewert der Trockensubstanz B-[w] = 0,042.

---

303) ***B. Sekla,*** Esterolyt. proc. and durat. of life. Brit. Jl. of exp. Biol. **6**, 161 (1928). BPh **52**, 58. — 304) ***V.B. Wigglesworth,*** Dig. in the cockroach III. Biochem. Jl. **22**, 150 (1928). — 305) ***E. A. T. Nicol,*** Feed. mech. . . . in Sabella pavonina. Trans. Roy. Soc. Edinburgh **56**, 537 (1930) cit. n. 295. — 306) ***H. Autrum, E. Graetz,*** Lip. Ferm. von Hirudo etc. Zs. vgl. Phys. 21, 429 (1934); BPh 84, 377. — 307) ***F. Haurowitz, H. Waelsch,*** Chem. Zus. von Nebella spirans, Zs. phys. Chem. **161**, 300 (1926).

II. Phytolipasen.

§ 279. Das Gebiet der pflanzlichen Lipasen ist — ein erstaunliches Unikum in der Fermentforschung —, seit dem Erscheinen des Hauptwerkes fast garnicht bearbeitet worden. In den wichtigen Problemen ist man über die vergeblichen Versuche WILLSTÄTTERS, das Enzym mit seinem eigentlichen kolloiden Träger aus der Verankerung an die Zellproteine in eine Lösung zu bekommen, nicht hinausgelangt, und so stehen wir auch heute der Untersuchung des eigentlichen Enzyms ohne Waffen gegenüber. Auch die eigenartigen Umwandlungen der Enzymwirkung bei der Samenkeimung, das Auftreten der Blastolipase WILLSTÄTTERS (§ 284) sind nicht weiter aufgehellt worden. So sind denn nur eine Reihe von Einzelbeobachtungen zu erwähnen.

Darstellung und Eigenschaften: Die bereits von WILLSTÄTTER (*l. c. 337*) widerlegte angebliche Darstellung der Ricinusl. in wässeriger Lösung von FALK c.s. ist von diesem neuerdings behauptet worden (**1**). Das so vorliegende Präparat soll eine Reihe von Estern verschieden stark spalten, ob mit Wasser oder NaCl-Lösung hergestellt.

Einwirkung äußerer Faktoren: In den Früchten von *Ricinus* selbst nimmt die Aktivität sehr langsam ab, nach 2—3 Jahren hört die Abnahme auf. Erhitzen der getrockneten Früchte auf 130° 1 h schwächt um $^{1}/_{3}$ (GUILLEMET **2**)). Der opt. ph der Ricinus-Lipase ist erneut von GUILLEMET **3**) bestimmt worden. Er fand für Cotton-Öl in Acetatpuffer 3,6, für Citronensäurepuffer 4,3. Die Abweichungen gegenüber WILLSTÄTTER (4,7—5,0) (*l. c. 337*) will er durch geringen Eiweißgehalt seiner nach der NICLOUXschen Methode hergestellten Präparate erklären. Das ph-Opt. von 4, 7 in der „Sahne" finden auch BRAND c. s. **4**); Blastolipase 6,0 (NICOLAI **5**)).

Dagegen geben FALK c.s. (l. c. 1) je nach Art der Ester bei ihrem „wasserlöslichen" Präparat ph = 5,0 — 7,0 an. Auch SULLIVAN **6**) findet bei Triacetin ph = 7—8, bei Glyceriden saures Optimum (Weizensamen). Calcium als $CaCl_2$ fördert bis zu einer Konz. von 0,5 $^{0}/_{00}$, darüber hemmt es, bei 3 $^{0}/_{00}$ total, ebenso $CaSO_4$ (ROTINI **7**)). Ca aktivirt auch die L. aus Papain (SANDBERG c.s. **8**)).

Blastolipase. WILLSTÄTTER hatte schon darauf hingewiesen, daß eine ähnliche, aber nicht zu echter Blastol. führende Umwandlung dadurch herbeigeführt wird, daß man die fermenthaltige „Sahne" mit Säure behandelt. Diese Umwandlung haben BRAND c. s. **4**) erneut beschrieben. Durch wässerige Säure vom ph 4,7 verschiebt sich das Optimum nach 5,6, und die vorher nicht auffindbare synthetische Wirkung tritt auf. Diese „aktivirte" L. ist alkaliempfindlich. Der Vorgang ist nach BRAND die Loslösung des Enzyms von einem Samenprotein bei dessen isoel. Punkt. — Eine Blastol. fand NICOLAI **5**) in keimenden Kiefernsamen, opt. ph ca. 6,0. — Auch die L. aus rohem Papain ähnelt nach ihrem opt. ph 5,8—6,2 der Blastol. (SANDBERG c. s. **8**)).

---

1) ***J. Lorberblatt, K. G. Falk,*** Esterhydr. enz. of castor bean. Jl. Amer. Chem. Soc. **48**, 1655 (1926). — 2) ***R. Guillemet,*** Pouv. lipol. de . . . grains de ricin. Soc. Biol. **108**, 779 (1931). — 3) ***R. Guillemet,*** ph-Opt. d'hydrol. des huiles etc. Soc. Biol. **108**, 781 (1931). — 4) ***E. Brand, M. Sandberg,*** Unity of castor lip. Proc. Soc. Exp. Biol. **23**, 541 (1926). S.A. — 5) ***H. W. Nicolai,*** Lip. in keim. Kiefernsamen. Bioch. Zs. **174**, 373 (1926). — 6) ***B. Sullivan, M. A. Howe,*** Lip. of wheat. Jl. Amer. Chem. Soc. **55**, 320 (1933). — 7) ***O. F. Rotini,*** Infl. d. calcio s. attiv. d. lip. Ann. Labor. Ric. Ferm. Spallanzani **1**, 245 (1930). — 8) ***M. Sandberg, E. Brand,*** On papain lip. Jl. of Biol. Chem. **64**, 59 (1925). S.A.

Wirkungen. Im Gegensatz zu allen Angaben über Ricinuslipase u. ä. — außer den unzulänglichen Befunden von FALK c.s. — soll die Lipase aus *Ficus carica* Triolein garnicht angreifen, wohl aber Butyrine (VISCO 9)).

Die synthetische Wirkung ist an durch Säure aktivirtem Cytoplasma nach NICLOUX von MOREL und VELLUZ **10), 11)** weiter untersucht worden (das also der Blastolipase nahesteht). Die Reaction ist trimolekular reversibel (2 Mole Fettsäure + 1 Glycerin = Diglycerid + H_2O).

Die Geschwindigkeitskonstante ist umgekehrt proportional der Jodzahl, d. h. ungesättigte Säuren verlangsamen die Reaktion in beiden Richtungen (?). Angeblich kann die Ricinusl. nur die beiden primären OH-Gruppen im Glycerol verestern, die sekundäre nicht. Dagegen verestert sie Cyclohexanol und zwei Cyclohexan-diole (1,2 und 1,4) nach 12 Tagen zu 63 %. Methylirung setzt stark herab, 2 Methyle mehr als eins; 1, 3, 4, Dimethyl-cyclohexanol nur noch 3,3 %. Borneol, Menthol und Cholesterol (?) sind unangreifbar. Die Hemmung ist eine sterische Hinderung **(12)**. Sekundäre Alkohole sind schwerer, tertiäre garnicht zu verestern. Bei Alkoholen wie Säuren steigt die Wirkung mit der Kettenlänge. Säuren bis C_6 sind überhaupt zur Synthese unfähig **(13)**.

Vorkommen. Verschiedene Ricinusarten hat GUILLEMET (l. c. 2) auf ihren Gehalt untersucht. Am stärksten wirkt *R. sanguineus* (Marokko). In den Nigersamen (*Guizotia abyssinica*) findet sich um so mehr L., je höher der Ölgehalt ist **(14)**; in Kiefernsamen ständige Zunahme während der Keimung (manometrische Methode), wenn man die Werte auf das Trockengewicht des Endosperms bezieht (NICOLAI, l. c. 5).

Lipasen der Kryptogamen. Diese Enzyme weichen, wie dies so häufig der Fall ist, weit ab von den L. der höheren Pflanzen und nähern sich den tierischen L. besonders dadurch, daß sie wie diese extrahirbar sind, und man sie somit als lösliche Systeme untersuchen kann. So sind sie denn auch wie diese in bezug auf Wirkung, Konfigurations-Spezifität, Kinetik, Abhängigkeit von äußeren Faktoren in neuerer Zeit mit tierischen Enzymen verglichen worden, worauf hier nicht nochmals zurückzukommen ist. Dies gilt namentlich für die L. von *Aspergillus Oryzae*, die Taka-Esterase. Sie zeichnet sich durch einen auffallend hohen optim. ph aus (ca 9), während er bei den Bakterienlipasen meist etwas über 7 liegt, die also auch darin den tierischen Gewebsl. ähneln. Bei *Asp. niger* opt. ph = 7,8 **(15)**.

Über spezifische Gifthemmungen an Bakterienl. habe ich nur eine Angabe finden können (TAMMISTO, s. u.). ferner hat OGAWA **16)** an der Taka-Esterase gefunden, daß sie praktisch resistent gegen Atoxyl, Chinin und NaF ist.

Die Hefenlipase (Bier- und Preßhefe) wird durch Phosphat bei ph = 6,8 sehr schnell freigelegt (GORBACH **17**)). Der opt. ph liegt bei 6,6—6,8, optimale Temp. 30°, 60° schädigt stark.

Preßhefen sind reicher als Bierhefen. Künstliche Verfettung der Hefe steigert ihren Lipasegehalt um 42 %. Auch durch Autolyse der Hefe mit Chloroform oder Glycerol erhält man wirksame Extrakte.

---

9) ***S. Visco,*** Sui ferm. esist. nel latice del ficus carica. Arch. di Farm. sper. **38**, 243 (1924). — 10) ***A. Morel, L. Velluz,*** Reversib. de l'act. diast. de la graine de ricin. Soc. Biol. **98**, 230, (1928). C. R. **186**, 43 (1928). — 11) ***Dies.,*** Synth. bioch. (et hydrol.) . . . des glycerides. Bull. Soc. Chim. Biol. **10**, 478, 1213, 1227 (1928). — 12) ***L. Velluz, P. Sauleau,*** Synth. bioch. des esters gras de qu. cyclohexanoles. C. R. **197**, 277 (1933). — 13) ***L. Velluz,*** Synth. des esters par la lip. du ricin. Bull. Soc. Chim. Biol. **16**, 909 (1934). BPh 81, 657. — 14) ***D. L. Sahasrabuddhe, N. P. Kale,*** Form. of oil in niger-seeds. Indian Jl. Agr. Sci. **3**, 57 (1933). — 15) ***A. Juracec,*** Lip. von Asp. niger etc. Bull. Sect. Sci. Acad. Roum. **18**, 103 (1930). BPh **59**, 805. — 16) ***J. Ogawa,*** Fettsp. F. der Taka-Diast. Bioch. Zs. **149**, 216 (1924). — 17) ***G. Gorbach, H. Güntner,*** Hefelipase. Sitzber. Akad. Wiss. Wien IIb **141**, 415 (1932).

Oidium lactis enthält eine L., die nur z. T. in die Kulturfiltrate übergeht; ihre Bildung ist abhängig vom Milieu, am stärksten in Glucose mit 2—3 % Öl, mehr Öl hemmt. Am meisten in Kulturen bis zu 2 Wochen. Temp. Opt. 21—26°, opt. ph = 5,0. Zerlegt auch reine Triglyceride (PLOTKINA **18**)). Sie ist also im allgemeinen der L. der höheren Pflanzen ähnlich. Dagegen ist die „Pilz-Esterase" von *Aspergillus niger*, die in die Präparate von Tannase mit eingeht, der Leberlipase ähnlich (DYCKERHOFF c. s. **18a**); sie wird bei 40° und ph 8,9 zerstört.

Bakterienlipase weist BERRY **19**) mit einer eigenartigen Methode nach: er züchtet auf Agar mit Zusatz von Butter, Cottonöl oder Sojaöl. Nach 48 h wird eine gesätt. Lösung von $CuSO_4$ über die Platte gegossen. Wo Fettsäuren abgespalten sind, erscheinen Striche unlöslichen grünen Kupfersalzes auf der Platte, nach deren Intensität man ungefähr die lipatische Kraft schätzen kann.

So fand er wirksam: *Staphyl. aureus* und *albus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas fluorescens* u. a. Negativ: *Escherichia* (*Bact.*) *coli*, *Bac. subtilis*, *mycoides* u. a.

Nach FALK **20**) ist bei Pneumococcen der Gehalt durchaus vom Nährboden abhängig. Aus *B. coli* erhielten Lipase durch Gefrierzerstörung der Leiber, Filtration durch BERKEFELD-FILTER LOEWENSTEIN c. s. **21**). L. von *Pyocyaneus* (PLOTKINA **18**)) ebenfalls milieu-abhängig, geht in die Kulturflüss. über. Temp. Opt. 23°, ph-Opt. ca. 7.

Synthetische Wirkung mit einem Trockenenzym (Alkoholfällung der Bouillonkulturen) fand v. D. WALLE **22**) bei *Pyocyaneus*, *Staphyl. aureus*, *Prodigiosus*; *B. coli*, *dysenteriae* (*Shiga-Kruse*) zeigten keine Wirkung.

Bac. fluorescens liquefaciens und *prodigiosus*: genauere Untersuchung TAMMISTO **23**). Wichtigste Befunde (neben zahlreichen Angaben über die lipatische Wirkung der Leiber selbst, auch bei vielen anderen Bakterien): Abhängigkeit der Wirkung vom Milieu und dem Alter der Kulturen; am besten 2tägige Kulturen bei Tributyrin als alleiniger C-Quelle. Trockenpräparate von *Prodigiosus*: Temp.-Opt. 32—37°, bei 70° in 10′ zu 90 %, 80° vollkommen zerstört. Elution mit Glycerin, 1 % Diammonphosphat + NH_3. ph-Opt. 8,3—8,6. 60° in 10′ vernichtet. Ca-Oleat aktivirt sehr stark, fast auf das 9fache, Albumin weniger. Atoxylfest, chininempfindlich, auch NaF hemmt. Weitere Reinigung durch mehrfache Adsorption an verschiedene Sorten $Al(OH)_3$ ergibt in 30 % Ausbeute eiweißfreie Lipase, ohne die Eigenschaften zu ändern. Das Enzym ähnelt nach Darstellung und Eigenschaften stark der Pankreas-lipase.

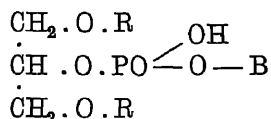
---

18) ***A. Plotkina***, Einfl. der Zus. des Milieus auf die Lip.-Bildg. (russ.) (1929). BPh **55**, 254. — 18a) ***H. Dyckerhoff***, ***R. Armbruster***, Tannase. Zs. phys. Chem. **219**, 38 (1933) S.A. — 19) ***J. A. Berry***, Det. of microbial lip. by copper soap form. Jl. of bact. **25**, 433 (1933). BPh **75**, 159. — 20) ***K. G. Falk***, ***G. Mac Guire***, Lip. act. of ... pneumococci. Jl. of Biol. Chem. **97**, 651 (1932). **105**, 669 (1934). — 21) ***L. Loewenstein***, ***W. L. Fleming***, ***J. M. Neill***, Lact. and lip. of the colon bac. Jl. of exp. Med. **49**, 475 (1929). — 22) ***N. van der Walle***, Synth. Wirk. bakt. Lip. Zbl. Bact. (II) **70**, 369 (1927). Ned. Tijdschr. voor Hyg. etc. **1**, 71. BPh **87**, 196. — 23) ***E. S. Tammisto***, Lip. der Bakt. Diss. Helsinki 1933, Ann. Acad. Sci. Fenn. A **38**, 1 (1933). BPh **74**, 344, **84**, 310.

B. Lecithasen und Cholin-Esterasen.

§ 280. Die Frage, ob es eigene Enzyme für die Zerlegung der Phosphatide, kurz Lecithasen gibt, oder ob die erste Zerlegung dieser Stoffe den ganz normalen Lipasen der tierischen Sekrete und Gewebe, sowie den diesen nahestehenden mikrobiellen Lipasen vom Typus Taka-Esterase zukommt, haben wir im H.W. offen lassen müssen. Sie ist auch heute noch nicht restlos geklärt.

Immerhin läßt sich das Problem einengen. Wir wissen heute sicher, daß die Phosphatidzerlegung angesichts des komplexen Baus dieser Stoffe ein mehrphasiger Prozess ist, und daß auch wie stets mehrere Enzyme eingreifen. Die Phosphatide haben — wenn wir hier nur Lecithine und Kephaline betrachten, von der Zerlegung der Sphingomyeline wissen wir nichts — im Grundsatz folgenden Bau: an ein Kerngerüst von Glycerol sind erstens 2 Fettsäuren (R) gebunden, an das dritte OH eine Phosphorsäure, und an ein zweites OH dieser PhS. eine Base (B), Cholin oder Colamin:

$$\begin{array}{l} CH_2 . O . R \qquad \quad {}^{\diagup OH} \\ CH \ . O . PO \diagdown O - B \\ CH_2 . O . R \end{array}$$

Diese Bindungen zu lösen sind im Prinzip schon zwei Gruppen zweifellos verschiedener Enzyme nötig: 1) eine oder zwei Glycerinesterasen, also den Lipasen nahestehende Enzyme, die eine oder beide R vom Glycerol ablösen; 2) eine oder zwei Phosphatasen, zweifellos von diesen verschieden, welche die Bindung zwischen Glycerol und Phosphorsäure, und zwischen Cholin und PhS. lösen.

Diese sollen auch insofern verschieden sein, als eine eigene Cholinphosphatase nur diese letztere Bindung löst und Glycerin-PhS. zurückläßt; es bliebe dann nur noch die Frage, ob die Glycero-phosphatase mit dem allgemein „Phosphatase" genannten Enzym identisch oder wieder ein eigenes Enzym ist; das erstere ist der Fall; es gibt keine eigene Glycerophosphatase (§ 283). Es scheinen beide Abbauprozesse vorzukommen: erst Abspaltung des Cholins von der Glycerol-PhS. oder erst Abspaltung der Cholin-PhS. vom Glycerol.

Hier handelt es sich also nur um die quasi „Lipase". Es ist auch heute noch nicht ausgemacht, ob hier ganz gewöhnliche L. am Werke sind, um eine oder beide Fettsäuren vom Glycerol abzulösen. Es gibt allerdings die Tatsache zu denken, daß die Ablösung einer Fettsäure eine sehr häufige und charakterische biologische Reaktion ist, die zu den interessanten Lysolecithinen resp. Lysokephalinen führt, während andrerseits zu ganz anderen Zwecken, nämlich der Umwandlung der Fette im Stoffwechsel, ebensowohl die Bindung wie die Ablösung beider Fettsäuren vor sich gehen muß.

Es ist also die Vorstellung naheliegend, daß hierbei erstens zwei verschiedene Enzyme vorliegen, und zweitens beide keine normalen Lipasen sind. Diese Ansicht

ist insbesondere von BELFANTI 1) und CONTARDI 2) entwickelt worden, die eine eigene **Lecithase A**, die nur eine — und zwar die ungesättigte — Fettsäure ablöst, von einer **Lecithase B** unterscheiden, die aus Lysolecithin die zweite Fettsäure (Palmitinsäure) abspaltet und ein Cholin-glycerophosphat hinterläßt. Beide Enzyme greifen normale Fette nicht an. Eine völlig exakte Durchforschung liegt noch nicht vor.

So ist es denn auch nicht verwunderlich, wenn unter dem Stichwort „Lecithase" noch die verschiedenartigsten Dinge laufen, je nachdem, welche Phase der ganzen Lecithinspaltung gemessen wird. Am ehesten ist theoretisch noch die Verminderung des Substrates als Methode richtig, denn diese kann ja ohne die Lecithase A nicht beginnen; andere aber nehmen etwa die abgespaltene Phosphorsäure als Maßstab, wie z. B. KING 3), trotzdem er auch zwischen Lecithase und Phosphatase unterscheidet. Diese Arbeiten werden also bei Phosphatase (§ 285) behandelt werden (Cholin-Phosphatase). Das Verschwinden des Lecithins allein als Massstab zu nehmen, ist auch wieder bedenklich, da es nach PAAL 4) leicht spontan zerfällt, besonders bei Gegenwart von Alkohol; es gibt schon beim Aufbewahren im Exsikkator Fettsäuren ab (4a). Allerdings erfolgte unter Wirkung von hochgereinigter Pankreaslipase eine erheblich stärkere Cholinabspaltung. BRUNIUS 5) fand bei Pankreaslip. auf Lecithin weder Spaltung des Lecithins noch freigesetzte Phosphorsäure.

Zu diesen unklaren Problemen gesellt sich noch ein weiteres. Im tierischen Körper, Blut und Geweben, kommt ein Enzym vor, das die Ester des Cholins mit niederen Fettsäuren, vor allem Essigsäure (Acetylcholin) spaltet. Acetylcholin und andere analoge Ester spielen eine erhebliche physiologische Rolle als Kreislaufhormone etc. („Vagus-Stoff", OTTO LOEWI's). Ursprünglich hielt man dieses Enzym einfach für Blut- resp. Organlipase; es haben sich aber in der Verteilung der Wirksamkeiten Differenzen herausgestellt, die es wahrscheinlich machen, daß es eigene „Cholinesterasen" gibt. Es handelt sich hier um Ester an der Alkoholgruppe des Cholins, die auch bei der Schreibung als komplexe Base frei ist: $^{+}(CH_3)_3N \cdot CH_2 \cdot CH_2OH$, da die normale Salzbildung am N erfolgt, die Esterifizirung aber am OH.

1) Lecithase A und B.

Das Enzym, das aus Phosphatiden unter Abspaltung eines Fettsäurerestes (Ölsäure) die giftig wirkenden Lysocithine erzeugt, ist implicite schon lange aus der Tatsache bekannt, daß die Schlangengifte diese Reaktion vornehmen, und daß ihr haemolytisches Prinzip eben dieses, ursprünglich „Cobralecithid" genannte **Lysocithin** (DELEZENNE) ist. Darüber noch Einiges unten als Ergänzung zum Hauptwerk § 281. Dort ist auch bereits angegeben worden, daß man im Pankreassaft ebenfalls solche indirekte Hämolyse gefunden hat (*l. c. 320—322*). Dieses Lysocithin ist im Cobralecithid durch KYES und LÜDECKE nachgewiesen worden, und so lag es nahe, daß die Hämolyse durch Pankreas auf analogen Produkten beruht (Literatur auch bei 6) und 23)).

BELFANTI 6) hat dann 1924 dieses Hämolysin des Pankreas näher untersucht und seine Identität mit einem Lysocithin erwiesen; er fand es auch in geringer Menge in Speicheldrüse und Thymus. Dasselbe Produkt liefern alle Gifte von Schlangen und Bienen.

---

1) ***S. Belfanti,*** La degrad. d. lecitine etc. (Zusammenf.) Fis. e Med. **4,** H. 9 (1933). S.A.; dieselbe Arbeit französ.: Dégrad. des lecith. etc. Arch. ital. Biol. **91,** 139 (1934). S.A. — 2) ***A. Contardi, A. Ercoli,*** Enzym. Spalt. der Lecithine etc. Bioch. Zs. **261,** 275 (1933). S.A. — 3) ***E. J. King,*** Enzym. hydrol. of (lecithin) (phosphatides) Biochem. Jl. **25,** 799, **27,** 403, **28,** 476 (1931/4). — 4) ***H. Paal,*** Spaltbark. des Lecithins. Bioch. Zs. **211,** 244 (1929). — 4a) ***H. Fischgold, E. Chain,*** Spont. Zers. von Lecithin. Biochem. Jl. **28,** 2045 (1934) Ch. Cbl. **1935,** I, 2382. — 5) ***E. Brunius,*** Enzym. Phosphatidspalt. Ark. för Kemi 10 A, Nr. 8 (1929). — 6) ***S. Belfanti,*** Hämoleukolysin des Pankr. etc. Bioch. Zs. **154,** 148 (1924). S.A.

Durch Verdauung von Eigelb mit Pankreasextrakt oder Handels-Pankreatin gelang es auch NIKUNO 7), das Lysolecithin rein darzustellen, und mit dem aus Schlangengift zu identifizieren, das schließlich ganz rein (frei von Lysokephalin) von KING 8) dargestellt worden ist (Gift von *Bothrops atrox* auf Eigelb); weiter fand Lysolecithin in polirtem Reis IWATA 9).

Das dabei wirksame Enzym haben dann BELFANTI c. s. 10) dargestellt (Pferdepankreas), CONTARDI 2) aus Reiskleie. Es wirkt absolut nicht weiter als bis zur Lysocithinstufe; selbst nach Monaten bleibt dessen hämolytische Wirkung unverändert, Cholin tritt nicht auf.

Über die Eigenschaften dieses Enzyms (**Lecithase A**) ist noch nicht viel zu sagen. Es ist sehr empfindlich, man muß ganz frische Drüsen benutzen. Extraktion mit Wasser; mehrfache Alkoholfällung. Es ist halbwegs gereinigt, aber noch nicht eiweißfrei erhalten. Temperaturoptimum ca. 37°; bei 60° in 5′ inaktivirt. Opt. ph = 6,8—7,0, unter 5,7 keine Wirkung, über 7,6 langsamerer Abfall. KING (l. c. 8) gibt für die gesamte erste Phase (Abspaltung der Fettsäuren) 7,5 an.

Gesättigtes Lecithin (synthetisch) wird nicht angegriffen, die Ölsäure ist also Vorbedingung für die Affinität des Enzyms (l. c. 23), auch Phytin ist resistent.

Die Wirkung von Giften ist bisher sehr schwer zu registriren, da sehr häufig nur die Wirkung auf den Gesamtkomplex gemessen wurde. Soweit Abspaltung von Phosphorsäure gemessen wurde, werden wir die Angaben bei Phosphatasen (Cholin-Phosphatase) § 285 bringen. Soweit Abnahme des Lecithins gemessen wurde, kann man dies vorläufig auf die Lecithase A beziehen; diese Angaben können also hier gegeben werden. Morphin in kleinen Dosen wirkt fördernd (< 0,02 %), 0,05 % hemmend. Morphininjektionen setzen bei Ziegen, Pferden, Menschen den Lecithingehalt des Blutes herab (KEESER 11)).

Über die **Lecithase B**, die die zweite Fettsäure abspaltet, ist noch viel weniger bekannt. Wie wir sehen werden, sind zahlreiche Fälle beschrieben, in denen alle Enzyme am Werke sind, so daß L. total gespalten wird, neben solchen, in denen Lecithase A abgetrennt werden kann. Dagegen finde ich bisher nur eine Angabe, daß Lecithase A praktisch fehlt, und nur Lysocithin (unter völliger Zerlegung) angegriffen wird; dies gibt KING (l. c. 8) an für das Enzymgemisch des Knochens; quantitative Unterschiede zu gunsten des Lysolecithins zeigt auch die Darmschleimhaut. CONTARDI (l. c. 2) fand diese Lecithase B in der Reiskleie nach Alterung, wobei A verloren gegangen ist, oder durch Behandlung mit Bleiacetat. Das Enzym greift Lysolecithin in Substanz an; und bringt es zum Verschwinden (keine hämolysirende Wirkung mehr). Es ist aber keine glatte Spaltung, sondern es entsteht ein sekundäres Produkt, das CONTARDI für ein Salz der abgespaltenen gesättigten Säure mit Lysocithin hält.

Sehr unübersichtliche Verhältnisse gibt GRONCHI 12) für Extrakte aus Nebennieren-Rinde an. Diese enthält hämolysirende Stoffe, den Lysocithinen ähnlich, die bei Skorbut vermehrt sind. Eine Zerlegung von Phosphatiden durch Extrakte aus NNR hatte CIACCIO (1915) beobachtet, ohne auf Lysocithine zu achten, er gibt nur Abspaltung von Fettsäuren an. GRONCHI fand aber auch beim Suchen danach keine Lysocithine, es wurden beide Fettsäuren abgespalten. (Im Vergleichsversuch mit Pankreas wurde Lysocithin gefunden.) Andererseits wird zugesetztes Lysocithin langsam abgebaut.

---

7) ***Z. Nikuno,*** Format. of lysolecithin from egg-yolk etc. Proc. Imp. Acad. Tokyo **8**, 300 (1932), Bull. Soc. Agr. Chem. Japan **8**, 104 (1932). — 8) ***E. J. King, M. Dolan,*** Enzym. hydrol. of phosphatides. Biochem. Jl. **27**, 403 (1933). — 9) ***M. Iwata,*** Occurr. of lysolecithin in pol. rice. Proc. Imp. Akad. Tokyo **6**, 212 (1930). — 10) ***S. Belfanti, C. Arnaudi,*** Lécithase du pancr. Boll. Sez. Ital. Soc. Internat. Microbiol. XI (1932). S.A.; Arch. ital. de Biol. **88**, 157 (1933). — 11) ***E. Keeser,*** Morphin und Ferm. II. Arch. exp. Path. **171**, 311 (1933). S.A. — 12) ***V. Gronchi,*** Fosfatidasi d. corteccia surrenale etc. Boll. Soc. ital. Biol. **8**, 1596, 1599 (1933).

Diese Versuche lassen mit der Möglichkeit rechnen, daß Lecithase B sich insofern grundsätzlich von A unterscheidet, daß sie direkt und symmetrisch beide Fettsäuren abspaltet, also auf komplette Phosphatide wirkt, ohne daß überhaupt Lysolecithin entsteht; jedenfalls zerlegt sie aber Lysolecithin an sich auch.

Bei der Unklarheit der ganzen Sachlage seien noch einige biologische Befunde hier angeführt, die sich einfach mit „Lecithase" als Gesamtbegriff beschäftigen, ohne daß wir auf die Differenzirung hier eingehen wollen. Zum Teil haben diese Arbeiten wieder die Tendenz, aus angeblich nachgewiesenen Schwankungen im Gehalt an „lipoidspaltenden Enzymen" weitgehende Schlüsse auf wichtige Stoffwechselprozesse an den Lipoiden zu ziehen, eine Tendenz, die wir leider auch bei vielen anderen Enzymarbeiten verzeichnen müssen. Sind solche Versuche häufig schon methodisch ganz verfrüht, weil eben eine exakte Messung der wahren Enzymstärke nicht möglich ist, so ist auch rein deduktiv die Übertragung solcher Befunde auf die schwierigsten Stoffwechselprobleme vorläufig meist noch völlig abwegig. Wir mußten darauf bei Lipasen hinweisen und werden leider immer wieder dazu genötigt sein.

Hier handelt es zich z. B. um Probleme der Avitaminosen (Beriberi und Skorbut), die man mit diesen Lecithasen und der Entstehung hämolysirender Stoffe zusammenbringen will. Über die Beri-beri-Frage im Besonderen s. BELFANTI (l. c. 1) **14)**, **15)** und CONTARDI (l. c. 2), die eine nahe Verwandtschaft zwischen Vitamin B_1 und diesem Enzymkomplex annehmen, s. a. CUBONI **16)**.

Weiter hat VIALE 17) dieses Enzymproblem mit dem damals noch völlig ungeklärten Problem der Funktion der Nebennieren-Rinde verkoppelt. Bei normalen Tieren enthalten danach neben den NN. selbst (vgl. GRONCHI 12)) auch die Muskeln reichlich „Lecithase" (Abbau von Lecithin gemessen nach verschiedenen Methoden), während sie im Muskel bei Insuffizienz oder nach Exstirpation der NN. fehlen oder stark vermindert sind. Das soll nun die Funktionsstörung der Muskulatur erklären. Die Nebennierenstörung soll mit der Unfähigkeit zusammenhängen, Cholin als Rindenhormon zu bilden. Nebennierenvenenblut führt Lecithase aus dem Organ ab in den Kreislauf (BIANCO 18)).

Wenn man Kaninchen gleichzeitig Lecithin (per os) und „Lipase" (parenteral) zuführt, so sollen sie nach KANÓCZ 19)) durch die im Körper erfolgende Hämolyse an einer schweren Anämie erkranken, während zugleich der Quotient Lecithin: Cholesterol im Serum steigt. Cholesterol-zufuhr beseitigt diese Anämie. Ähnliche Bilder treten spontan auf bei konstitutioneller hämolyt. Anämie, Anämia perniciosa, hämol. Icterus.

Einfachere und sinnvollere Zwecke verfolgen folgende Arbeiten: PORTIS **20)** fand Lecithinabbau im Duodenalsaft, bei Ulcera vermindert, ebenso bei nicht kompensirten Herzfehlern. Den Abbau der Phosphatide bei der Autolyse der Leber hat ARTOM **21)** verfolgt. Da fast die gesamten Fettsäuren in der Leber in Form von Lecithinen und Kephalinen gegeben sind, hat dieser Vorgang als Modell für den Fettabbau in der Leber als Depot großes Interesse. Es handelt sich in der Hauptsache um kompletten Abbau; bei der Verdauung ist er gegenüber fastenden Tieren vermehrt, ebenso nach Leberreiz mit HCl.

Interessante Beziehungen zwischen Phosphatidspaltung und der zur Darmregulation nötigen Bildung von Cholin in der Darmwand haben ABDERHALDEN und PAFFRATH **22)** auf-

---

14) ***S. Belfanti,*** Dislocat. des lécith. du riz etc. Arch. ital. de Biol. **85,** 190 (1931). S.A. — 15) ***S. Belfanti, A. Contardi,*** Il Beri-beri etc. Atti 20. Reun. Soc. Ital. Progr. Sci. Milano 1931, Bd. I. S.A. — 16) ***E. Cuboni,*** Att. antiberiber. di estr. veget. etc. Boll. Ist. Sieroter, Milan. H. 4 (1933). S.A. — 17) ***G. Viale (T. Combes),*** Lecithinasen bei der Nebenniereninsuff. Rev. Méd. del Rosario (span.) **17,** 17. BPh **40,** 584. Soc. Biol. **97,** 265 (1927); Riv. di biol. **10,** 99 (1927/8). BPh **47,** 467. — 18) ***J. Bianco,*** Léc. et. lécithases dans le sang etc. Soc. Biol. **102,** 463 (1929). Bioch. Ter. Sper. **16,** 340 (1929). — 19) ***D. Kanócz,*** Ferm. Hämolyse. Zs. exp. Med. **91,** 56 (1933). — 20) ***S. A. Portis,*** Dig. of lecithin by pancr. enz. Jl. Amer. Med. Ass. **91,** 1248 (1928). — 21) ***C. Artom,*** Var. des lip. phosph. au cours de l'autol. du foie. Bull. Soc. Chim. Biol. **7,** 1099 (1925). — 22) ***E. Abderhalden, H. Paffrath,*** Bildung von Cholin etc. Fermentforsch. **8,** 284, 294, 299 (1925).

gedeckt. Der überlebende Säugetierdarm hat ein Depot an gebundenem Cholin, das er durch Spaltung in freies Cholin umwandeln kann. Der Pressaft enthält ein diese Spaltung katalysirendes Enzym. Seine Wirkung hängt vom Reizzustande der Darmnerven ab; bisweilen mißlang der Nachweis. Derselbe Pressaft enthält auch die Cholinesterase, die z. B. Acetylcholin zerlegt und bildet. (Synthese am besten bei saurer Reaktion).

In den **tierischen Giften** finden sich entweder beide L. oder nur A. So enthalten Schlangengift (von *Crotalus*, *Lachesis* u. a.) und Bienengift nur A, Wespengift auch B (CONTARDI 23)); diesem analog verhält sich Taka-Esterase (s. u.). Die Kephalinase aus Schlangengift (*Crotalus adamanteus*) hat DUNN 24) isoliert und durch Adsorption (Al_2O_3 C) gereinigt. Sie entspricht der Lecithase A BELFANTI's, aber sie repräsentiert nicht die volle Giftwirkung, es müssen noch andere toxische Substanzen vorhanden sein; die Hämolyse ist etwas langsamer als durch das unveränderte Crotalusgift.

Kräftige Lecithinspaltung (komplett) durch Takaesterase (*Aspergillus Oryzae*) ist lange bekannt (*l. c. 308a*). — Eine weitere Untersuchung liegt vor von PINCUSSEN und OYA 25), welche die Wirkung der Taka-Esterase auf Lecithin an der Hand der Freisetzung von Cholin und Phosphorsäure, also die Gesamtwirkung maßen. U.V.-Licht hemmt beide Wirkungen, die Phosphatase stärker. — Ricinuslipase spaltet über Lysocithin hinweg total 23).

Bei Bakterien ist L. (Freisetzung von Fettsäuren) ungleich verteilt (TODA 26)). Am stärksten wirken (lebende Bakterien) *Pyocyaneus* und *Prodigiosus*, sehr schwach *Staphylo-*, *Pneumo-*, *Gonococcus*. Nach der Wirkung ist die Säurefestigkeit verschwunden. Tuberkelbazillen sollen ihre Säurefestigkeit verlieren und sich schließlich auflösen, wenn man ihnen wässrige Lecithinemulsion zufügt (Wirkung freier Ölsäure) (ISABOLINSKY 27), TODA).

Lecithase und Immunhämolyse. Die bisher vorliegenden Versuche mit Lecithase haben Licht gebracht nur für die unspezifische Hämolyse, eben die rein toxische allgemeine Wirkung der Lysocithine. Die Frage, ob man auch für die wahrhaft spezifische Hämolyse etwas daraus entnehmen kann, mußten wir im H.W. offen lassen. Sehr viel weiter ist man auch heute noch nicht gekommen. Eine Deutung der artspezifischen Hämolyse auf Basis der bekannten Enzymwirkungen ist auch heute noch nicht möglich.

Die Fermenttheorie der spezifischen Hämolyse von KLOPSTOCK 28) denkt viel eher an eine Enzymwirkung auf das Stroma, also eine Protease; über die Mitwirkung von Lipasen ist kaum etwas bekannt. Es liegen dazu Ansätze von v. EULER c. s. 29), 30) vor. Es gilt, die Analogien auszubauen, die zwischen der Enzymwirkung und den Faktoren der Immunhämolyse gegeben sind:

Komplement a. BK—Ambozeptor }
Lipoid - spezif. inakt. Immunserum } und { Enzym—Albumin.
{ Lipoid—fettsaures Ca.

(EULER unterscheidet hier nicht zwischen „Lipase" und „Lecithase".)

Der Ambozeptor wirkt analog vermittelnd zwischen Komplement und BK, wie das Albumin zwischen Lipase und Substrat. Es sollen insbesondere die Affinitätskonstanten Komplement-

---

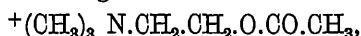
23) ***A. Contardi, Pia Latzer,*** Tier. Gifte in der Chemie. Bioch. Zs. **197**, 223 (1928). S.A. — 24) ***E. E. Dunn,*** Separ. of enz. etc. of the venom of Crotalus. Jl. of pharm. **50**, 393 (1934). — 25) ***L. Pincussen, T. Oya,*** Spalt. des Lecith. durch ... Taka-Esterase. Bioch. Zs. **215**, 365 (1929). S.A. — 26) ***T. Toda,*** Lecith. der Bakt. Zbl. Bakt. **117**, 489 (1930). — 27) ***M. Isabolinsky, W. Gitowitsch,*** Bakteriolyse der Tbc. Bac. Zs. Immun. **51**, 402 (1927). — 28) ***F. Klopstock,*** Ambozeptoren. Zbl. Bakt. **100**, 90 (1926). — 29) ***H. v. Euler, Sv. Gard, E. Brunius,*** Versuche über Lipase. Enzymchem. Studien über Hämolyse. Ark. för Kemi **10** A, Nr. 2, 5, **10** B Nr. 4, 8 (1929). — 30) ***E. Brunius,*** Enzym. Phosphatidspalt. etc. Ark. för Kemi **10** A, Nr. 8 (1929).

Hämolysin und Lipase-Substrat + Co-Adsorbens verglichen werden, was aber bisher noch nicht gelungen ist. Das thermostabile Hämolysin des Pankreas (Lysocithin) wird durch Serum gehemmt. Er wirkt genau so auf normale wie durch einen Immunambozeptor sensibilisierte BK. Der Ambozeptor konnte durch Fällung der Proteine, Dialyse und mehrfache Adsorption auf etwa 30fachen Titer gesteigert werden. Vorläufig steht allen weiteren Erörterungen noch die Tatsache im Wege, daß bei Immunhämolyse eine Lipoidspaltung zahlenmäßig nicht festzustellen ist, weder durch Fettsäurebestimmung (BRINKMANN und SZENT-GYÖRGYI **31**)), noch PhS-Abspaltung (BRUNIUS **30**)). Die Blutlipase kann nicht das Komplement sein, da sie nach völliger Komplementablenkung noch erhalten ist (**31**).

Zu diesem Punkt ist noch eine Arbeit von KOGAN **32**) zu erwähnen, der Mitwirkung einer Lipase bei der Hämolyse annimmt. Die entstehende saure Reaktion (ph<5) soll den Zusammenhang zwischen Stroma und Farbstoff so lockern, daß Hämolyse erfolgt. Für die Spezifität sagt dies natürlich wieder garnichts aus, ganz abgesehen davon, daß er gasometrisch gemessen hat und die Quelle der CO_2 entbindenden Säure bei seiner Versuchsanordnung nicht klar ist.

2) Cholin-Esterasen (33).

§ 280a. Acetylcholin, der Essigsäureester des Cholins an seiner Hydroxylgruppe:

$$^{+}(CH_3)_3\ N.CH_2.CH_2.O.CO.CH_3,$$

findet sich in Blut und Geweben und hat eine erhebliche physiologische Bedeutung als außerordentlich starker Reizstoff für das parasympathische System; es ist identisch oder nahe verwandt mit den „Vagusstoff" OTTO LOEWI's, der sich im Herzen auch normal, besonders aber nach Vagusreizung vorfindet. Er wird ebenso wie Acetylcholin durch Blut und Organe sowie Extrakte aus allerlei Geweben gespalten, so durch Darmschleimhaut (ABDERHALDEN **34**)), Froschherz (CLARK **35**)), Extrakte aus Herz, Darm, Leber vom Frosch (LOEWI **36**)), (Muskel sehr langsam); Blut von Kalt- und Warmblütern, besonders durch die Erythrocyten (PLATTNER c. s. **37—39**)) etc. Diese Zerlegung ist eine Verseifung des Esters mit Freisetzung von Cholin; erhitzte Extrakte (56°) sind unwirksam. Während im frisch herausgenommenen Froschherz der Vagusstoff erhalten bleibt, wird zugesetztes Acetylcholin zerlegt; beim Zerreiben verschwindet auch der natürlich enthaltene Vagusstoff. Bei erhaltener Struktur sind also Enzym und Substrat getrennt (ENGELHART und LOEWI **40**), **41**)). Während PLATTNER zuerst an eine unspezifische Oberflächenkatalyse dachte, nahm er dann selbst, ebenso wie schon 1914 DALE und dann ABDERHALDEN c. s. **34**) eine Enzymwirkung an, die von ENGELHART und LOEWI erwiesen wurde. STEDMAN c. s. **42**) schlugen für das Enzym den Namen Cholin-Esterase vor, unter der Annahme, daß hier ein eigenes Enzym vorliegt, was noch nicht völlig sicher, aber wahrscheinlich ist (s. u.). Die an sich gegebene unspezifische Zerlegung an Kohle-Oberflächen ist mit der Enzymwirkung nicht identisch.

31) ***R. Brinkmann, A. v. Szent-Györgyi,*** Lipol. Theorie der Immunhämolyse. Bioch. Zs. **146**, 212 (1924). — 32) ***E. Kogan,*** Mechan. der spezif. Hämolyse. Jl. exp. Biol. i Med. (russ.) **11**, Nr. 28 (1928), Zbl. Bakt. (Ref.) **98**, 69 (1930). — 33) ***R. Ammon,*** Cholinesterase, Erg. Enzymforsch. IV, 102, Leipzig 1935. S.A. — 34) ***E. Abderhalden, H. Paffrath,*** Synth. von Cholinestern etc. Fermentforsch. **8**, 299 (1925). — 35) ***A. J. Clark,*** Destruct. of acetylcholine by the ... heart. Jl. of Phys. **64**, 123 (1928). — 36) ***O. Loewi, E. Navratil,*** Schicksal des Vagusstoffes, Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **214**, 678, 689 (1927). S.A. — 37) ***O. Galehr, F. Plattner,*** Schicksal des Acetylchol. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **218**, 488, 506 (1927). — 38) ***F. Plattner c. s.,*** Schicks. des Acetylchol. etc. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **219**, 181, 678, 685, **220**, 606, **222**, 395 (1928/9). S.A. — 39) ***F. Plattner, H. Hintner,*** Spalt. von Acetylch. d. Organextr. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **225**, 19 (1930). S.A. — 40) ***E. Engelhart, O. Loewi,*** Ferm. Acetylcholinspalt. Arch. für exp. Path. **150**, 1 (1930). S.A. — 41) ***Dies.,*** Vagusstoffzerstör. im Herzen. Arch. internat. Pharm. **38**, 287 (1930). S.A. — 42) ***E. Stedmann c. s.,*** Choline-Esterase. Biochem. Jl. **26**, 2056, **27**, 1055 (1933). S.A.

Der Nachweis dieses Enzyms geschah zunächst nur biologisch: es wurde am geeigneten Objekt (Darm, Herz, Muskel von *Hirudo*) das Verschwinden der Reizwirkung des Acetylcholins verfolgt. STEDMANN arbeitete eine rein chemische Methode aus: er maß die freigesetzte Essigsäure durch Titration mit Bromthymolblau als Indikator, indem er den einmal eingestellten Blauton durch kontinuierliches Eintropfen von Lauge unverändert erhielt; die verbrauchte Lauge zeigt die gebildete Essigsäure an. Bessere Resultate ergab Butyrylcholin bei ph = 8,0, Kresolrot als Indikator. AMMON **43)** benutzte wie für Lipase die gasanalytische Präzisions-Methode im WARBURGschen Apparat.

Die Wirkung ließ sich feststellen auch für Propionyl- und Butyrylcholin (STEDMANN, SIMONART **44)**), Pyruvylcholin (MATTHES **45)**). Derivate höherer Choline (Acetyl-β-methylcholin, Acetylhomocholin) werden nach SIMONART schwächer zerlegt. Nach der Hydrolyse setzt eine oxydative Zerstörung des Cholin ein (BERNHEIM **46)**).

Acetylcolamin wird nicht angegriffen (AMMON, l. c. 33).

Die **Reversion der Wirkung**, Synthese von Acetylcholin, wurde mit Darmschleimhaut-Extrakt von ABDERHALDEN (l.c. 34) durchgeführt, bei optimalem ph (saure Reaktion) bis zu 0,8 %. AMMON c. s. **47)** gelang dasselbe mit Pferdeserum, aber in noch geringerem Ausmaße. Physostigmin hemmt auch hier. Synthese an Kohle findet nicht statt.

Eigenschaften. Temperaturempfindlichkeit unsicher, nach PLATTNER bei 56° allmähliche Inaktivierung, nach ABDERHALDEN aber Resistenz bis gegen 75°. Nach LOEWI ist Menschenblutesterase bei 58° resistent, Rinderblut nicht. Bei 0° keine Wirkung (LOEWI). Opt. ph = ca. 6, nach PLATTNER (l. c. 38, II) etwa 7,5 (bei Blut). Das Enzym unterscheidet sich in Bezug auf sein Verhalten gegen die üblichen Gifte erheblich von den dem betr. Organ zugehörigen eigentlichen Lipasen: so sind die Cholinesterasen aus Leber und Thyreoidea nicht chininfest, die aus Thyreoidea ist atoxylfest, die anderen relativ wenig empfindlich gegen Atoxyl. Narcotica hemmen nach PLATTNER (l. c. 38, IV) in der üblichen Weise nach dem Gesetz der homologen Reihen.

Besonders markant ist die starke Hemmung durch Stoffe mit ausgesprochener Parasympathicuswirkung. Zweifellos hat dies für deren pharmakologische Wirkung eine Bedeutung; es läßt sich z. B. die Acetylcholinwirkung nur dann quantitativ erfassen, wenn man die Zerlegung durch solche Mittel ausschaltet; auch im lebenden Tier ist dann Acetylcholin exakt nachzuweisen (FELDBERG **48)**). Am stärksten wirkt Physostigmin (ENGELHART u. LOEWI, l. c. 40), sowie die ähnlichen Prostigmin, Miotin (MATTHES), Die Hemmung ist reversibel; nach Dialyse Enzym wieder voll wirksam **(45)**.

Physostigmin hemmt noch total bei 0,001 mg in 2 cm³, und zu 50 % noch bei 5—10^{-6} mg (AMMON). Ähnlich Ergotamin, aber erst in etwas höheren Dosen (AMMON, MATTHES) und Muscarin. Atropin, Adrenalin (SIMONART), Strychnin, Pilocarpin, sind nur in großen Dosen (Milligramme) hemmend (AMMON). Physostigmin, Miotin etc. hemmen zwar auch die Serumlip. an sich, aber dort nicht so intensiv (vgl. § 266) (STEDMANN c. s. **49)**).

Cholin-Esterase ein eigenes Enzym? Diese Differenzen gegenüber den eigentlichen Lipasen sind zwar Argumente für die Sonderexistenz der Cholinesterase, aber keine

43) ***R. Ammon*, (*G. Voss*)**, Ferm. Spalt. des Acetylcholins. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **238**, 485 (1933) **235**, H. 4 (1935). S.A. — 44) ***A. Simonart***, Hydrol. de l'acetylcholine etc. Rev. Belge Sci. Méd. **3**, 757 (1931). BPh **65**, 133. — 45) ***K. Matthes***, Act. of blood on acetylchol. Jl. of Phys. **70**, 338 (1930). — 46) ***F. Bernheim c. s.***, Oxyd. of acetylcholine by tissues. Amer. Jl. Phys. **104**, 438 (1933). — 47) ***R. Ammon*, *H. Kwiatkowski***, Bild. von Acetylcholin im Serum. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **234**, 269 (1934). S.A. — 48) ***W. Feldberg c. s.***, Blutdrucksenkende Wirkung etc. (Cholin-Esterase) Arch. exp. Path. **170**, 560 (1933). Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **232**, 212 (1933), **234**, 333 (1934). — 49) ***Edg. Stedmann*, *Ellen Stedmann***, Inhib. act. of cert. ureth. etc. Biochem. Jl. **25**, 1147 (1931). S.A.

beweisenden; es liegt wie bei allen Esterasen die Möglichkeit vor, daß trotz gleicher Natur des Enzyms dort gerade die Acetylcholinwirkung infolge der Begleitstoffe anders beeinflußt wird wie die Tributyrinspaltung. Dies wird tatsächlich von PLATTNER und SIMONART angenommen, welch letzterer als weiteres Argument noch das Fehlen jeglicher Esterspaltung im Blute von *Homarus* hinzunimmt. PLATTNER vermißt die Spaltung in Milch.

Indessen geben die verschiedenartigen Verteilungen doch noch weitere Argumente für eine Dualität. Bei PLATTNER selbst fand TAKAHASHI **50)** eine ganz andere Reihenfolge der Tierarten für die Blutwirkung auf Tributyrin wie auf Acetylcholin.

Für letzteres hatten GALEHR und PLATTNER (l. c. 37) angegeben: Mensch>Rind>Hund>Pferd>Kaninchen>Katze, während sie bei Tributyrin lautet (§ 274): Kaninchen>Katze>Pferd>Mensch>Hund>Rind. STEDMANN c. s. (l. c. 42) vermißten die Acetylcholinspaltung in Präparaten aus Leber von Schwein und Katze, Pankreas vom Schwein. PLATTNER fand auffallende Spaltung von Ac. Ch. im Gehirn bei schwacher Lipasewirkung. Weitere Differenzen fand AMMON **43)**: Er vermißt die Spaltung von Ac. Ch. in vorgereinigten Extrakten aus Leber und Pankreas von Mensch **51)** und Schwein, ebenso Glycerin- und Glykolextrakten aus Trockenpulver von Darmschleimhaut; alle diese spalten andere Ester, aber nicht Ac. Ch., während die rohen Auszüge Ac. Ch. spalten **(39)**. Ähnlich verhält sich Blut von Rind und *Cavia* gegenüber Pferdeblut, das Ac. Ch. stark hydrolysiert. Ähnliche Mißverhältnisse fanden STEDMANN c. s. **52)** in verschiedenen Sera, z. B. starke Lipasewirkung bei Taube, Ratte, Kaninchen bei kaum vorhandener Ac. Ch.-Spaltung, umgekehrt bei Affe, Mensch, Hund (s. Tabelle). Verhältnis von Serum zu roten B.K. bei verschiedenen Tieren sehr verschieden **(33)**. Auch im bebrüteten Hühnerei ist das Enzym anders verteilt, als andere Lipasen: im Gelbei anfangs mehr, nachher ganz überwiegend im Embryo selbst, in der Dottersackhaut spärlich (AMMON **53)**). Sehr reichlich findet sich das Enzym im Blut von *Helix* und Muskel von *Hirudo* **(43)**.

Es ist also anscheinend wirklich die Cholin-Esterase ein eigenes Enzym.

Verteilung des Enzyms nach PLATTNER und HINTNER **39)**:

Ungefähr 50 % Zerstörung bewirkten die Extrakte aus	Nach Minuten	Ungefähr 50 % Zerstörung bewirkten die Extrakte	Nach Minuten
Leber (Kaninchen)	0,5 0,5 2, 2	Iris (Irides von 5 Kaninchen, 5 ccm Extraktionsmittel pro g)	13
„ (Katze)	4, 3	Lunge (Kaninchen)	18
„ (Hund)	1, 1, 5	Liquor (Mensch)	20
Pankreas (Hund)	0,3 0,3	„ (Mensch, 2 ccm in der	
„ (Katze)	5, 10, 10	Probe	20
Gehirn (Kaninchen)	2, 2, 2	Liquor (Meningitis 3 ccm in der	
„ (Katze)	1,5, 5	Probe	50
„ (Hund)	7, 7, 3	Herz (Ventrikel, Kaninchen)	30, 30, 12
Nebenniere (Hund)	2,5, 3	Skeletmuskel (Iliopsoas, Kanin-	
Dünndarmmuskulatur (Hund)	2,5, 4	chen)	30, 30, 20
Milz (Hund)	4	Thyreoidea (Hund	30
Uterus (Katze: 4 ccm Ex-		Nerv (Katze, Plexus lumb.)	30
traktionsmittel pro g Or-		Galle (Hund)	30
gan)	5	Niere (Kaninchen)	60, 40
Speicheldrüse (Hund, Submaxil-		Kammerwasser (Kaninchen)	120, 120
laris)	5	Speichel (Hund)	Nach 3 St.
Blutgefäße (Hundearterien)	5	Milch (Kuh)	keine Zer-
Thymus (Katze)	10	Harn (Mensch)	störung

50) ***W. Takahashi***, Tributyrinspalt. im Blut etc. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **225**, 42 (1930). S.A. — 51) ***R. Ammon, E. Tabor***, Menschenpankr. und Menschenleberesterase. Bioch. Zs. **267**, 26 (1933). S.A. — 52) ***E. Stedmann c. s.***, Cholin-Esterase of blood-serum. Biochem. Jl. **27**, 1055 (1933) S.A. — 53) ***R. Ammon, E. Schütte***, Verh. von Enzymen im Hühnerei etc. Bioch. Zs. **275**, 216 (1935) S.A.

das zwar in Rohextrakten aus Leber und Pankreas vorhanden ist, aber nicht in die gereinigten Präparate übergeht; seine Spezifität richtet sich anscheinend auf die quartäre Ammoniumbase des Alkohols.

Tabelle der Wirksamkeit verschiedener Sera (STEDMANN c.s. 51)).

	Substrate	cc. 0·02 N NaOH required to titrate acid liberated in 20 mins. Butyryl-choline	Acetyl-choline	Methyl-butyrate	Diminution in drop number in 40 mins. Tributyrin
A.	Monkey	8·8	3·45	0·15	13
	Man	4·95	2·6	0·15	10
	Dog	4·8	2·45	0·15	4
	Fox	2·4	—	0·05	0
B.	Horse	5·45	2·0	2·95	24
	Guinea-pig (*Cavia*)	3·75	1·35	4·7	72
	Cat	2·15	—	0·55	36
	Cat	1·9	—	0·55	60
C.	Pigeon	0·3	—	16·6	80
	Goose	0	—	3·65	44
	Duck	0·2	—	2·85	21
	Tortoise	0	—	1·95	—
	Mouse	0·4	—	1·75	96
D.	Pig	0·6	—	0	0
	Fowl	0·5	—	0·25	4
	Fowl	0·7	—	0·3	3
E.	Rat	0·05	—	1·05	18
	Rabbit	0·05	—	0·3	22
	Rabbit	0·1	—	0·25	23·5
F.	Goat	0·1	—	0	1
	Ox	0·05	—	0·05	0
	Sheep	0·1	—	0·05	0
	Ferret (*Putorius*)	0	—	0·05	11
	Frog	0	—	0	0
	Hedgehog (*Erinaceus*)	0	—	0	0

Bei Menschen ziemlich erhebliche Schwankungen.

Eine gewisse Reinigung der Cholinesterase und eine vorläufige Standardisierung haben STEDMANN c. s. (l. c. 42) durchgeführt. Sie nennen Volumzahl die Zahl der ccm von 0,0225/n Alkali, die zur Neutralisierung der entstandenen Säure verbraucht werden, wenn 100 ccm Serum oder daraus erhaltenes gelöstes Enzym einwirken, resp. Gewichtszahl, dasselbe für 1 g Trockensubstanz, z. B. nach Einwirkung von 100 ccm Serum auf 0,1 g Butyrylcholin Verbrauch = Volumzahl 465. Nach Dialyse (angewachsen auf 130 ccm) verbrauchten 1,3 ccm 4,8 ccm Alkali, also Volumzahl 480. So können diese Werte zur Kontrolle des Enzymgehaltes bei fortschreitender Reinigung dienen. Die Reinigung erfolgte in folgenden Etappen: Fällung mit 20 % Ammonsulfat, Zentrifugieren, Erhöhung auf 40 % Ammonsulfat, schwach ansäuern. Niederschlag reich an Enzym, abzentrifugiert. Extraktion mit 35 %igem Ammonsulfat, zentrifugiert, stehen lassen. Wieder bei 40 % ausfällen, Niederschlag in Wasser lösen, dialysieren. Gewichtszahl des Trockenrückstandes fast siebenmal die des Serums.

Die **biologische Bedeutung** dieses Enzyms ist zweifellos erheblich. Es regelt die Bildung und Wiederzerlegung dieser so unerhört aktiven Stoffe, deren Vorhandensein für die allerwichtigsten Lebensprozesse ebenso notwendig, wie eine zu starke Anhäufung gefährlich ist. Die Rolle dieser Ester ist wahrscheinlich noch größer, als man bisher angenommen hat, so hat DALE **53a)** auch einen Zusammenhang mit der willkürlichen Muskel-kontraktion hergestellt.

53a) ***H. H. Dale***, Chem. Ideas in Med. and Biol. Science 80, 343 (1934).

C. Tannasen, Chlorophyllase.

I. Tannase.

§ 281. Über dies im Hauptwerk § 287 behandelte Enzym ist seither sehr wenig gearbeitet worden. Methode zur Bestimmung der Gallussäure NICHOLSON **54)**, zur Gewinnung reinen Glucotannins NIERENSTEIN **55)**. FREUDENBERG **56)**, **57)** hat seine Studien insofern fortgesetzt, als er sein Verfahren der Darstellung von T. aus dem Mycel von *Aspergillus niger*, gezüchtet auf Myrobalanen-Extrakt (*Terminalia chebula*) verbessert hat. Darüber hat er selbst im Hauptw. Bd. III, S. 734 berichtet. Ebendort hat er auch seine Berechnung der Tannase-Einheit mitgeteilt. „*Spaltwert eines Präparates gleich der Anzahl mg, die nötig sind, um bei 33° in 24 h 1,082 g wasserfreies Methylgallat (entspr. 1 g Gallussäure), in 200 cm³ Wasser gelöst, zur Hälfte zu spalten.*"

Bei der Spaltung von Chebulinsäure in aceton-wässer-Lös. entstehen 51 % Gallussäure neben 2,5 % Glucose. Wenn man aber erst mit Wasser kocht, erhält man haupts. Digalloylglucose, und auch der Rest ist durch T. zerlegbar (**57**).

Der **optimale ph-Bereich** ist 3,1—4,1 beim Abbau ohne Puffer; wenn man mit Strontiumgallat puffert, ist die Reaktion bei 4,4—4,8 schneller. DYCKERHOFF c. s. **58)** fanden bei ihrem reineren Präparat 5—6.

Der Reaktionsverlauf ist monomolekular, wenig abhängig von den Substratkonz. zwischen m/10 und m/100 Methylgallat (DYCKERHOFF).

Nach NICHOLSON und NIERENSTEIN **59)** geht bei der Spaltung von Glucotannin Gallussäure verloren: Pyrogallol wird durch das Ferment tiefgreifend umgewandelt, färbt sich nicht mehr mit Fe-Salz; danach soll die Rohtannase aus *Aspergillus* ein weiteres Enzym enthalten, **Pyrogallase**, die „Gallussäure zerstört" (?) Es läßt sich allein gewinnen, wenn man das Salz auf Nährböden mit Pyrogallol, resp. Gallussäure züchtet.

Durch Verbesserung der Darstellungsmethode sind DYCKERHOFF c. s. **58)** zu einem Tannasepräparat von etwa 20fach größerer Wirksamkeit gelangt. Züchtung des Pilzes wie bei FREUDENBERG, Extraktion mit Wasser 1 : 10 (besser verdünnte Salzsäure), Fällung mit Aceton-Äther. Als **Einheit T.E.** gilt diejenige Enzymmenge, die ein Millimol Methylgallat in 50 ccm Wasser in 24 h bei 40° zur Hälfte spaltet, sie ist = 0,17 T.E. nach FREUDENBERG.

Das Ferment ist auch in wäss. Lös. sehr beständig; Abnahme in 1 Jahr 25 %. Ein beigemengtes Enzym, das andere aromatische Ester vom Typus Phenylacetat spaltet, eine gewöhnliche Esterase, läßt sich z. B. bei ph 8,9 inaktivieren; die Tannase ist ein

---

54) ***W. N. Nicholsen, D. Rhind,*** Quant. estim. of hydrol. of gallotannin by tannase. Analyst **49,** 505 (1925). — 55) ***M. Nierenstein c. s.,*** Gallotannin. Jl. Amer. Chem. Soc. **47,** 1726 (1925). — 56) ***K. Freudenberg, Fr. Blümmel, Th. Frank,*** Tannase II. Zs. phys. Chem. **164,** 262 (1927). — 57) ***K. Freudenberg, Th. Frank,*** Chebulinsäure III. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG) **452,** 303 (1927). — 58) ***H. Dyckerhoff, R. Armbruster,*** Tannase, Zs. phys. Chem. **219,** 38 (1933) S.A. — 59) ***W. N. Nicholsen, M. Nierenstein c. s.,*** Act. of tannase on gallotannin. Biochem. Jl. **25,** 752 (1931).

spezifisches Ferment, sie spaltet nur solche Ester, die mindestens zwei phenolische Hydroxyle in der Säurekomponente enthalten, von denen keines in Ortho-Stellung stehen darf.

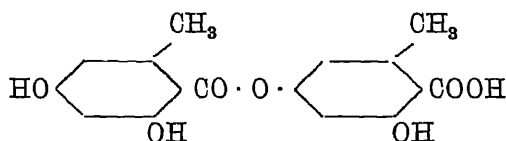
Unspaltbar also: Ester der β-Resorcylsäure und der Oxybenzoesäuren, spaltbar z. B. die Protocatechusäure. Unspaltbar auch Pyrogallol-acetat, weil hier das entscheidende Hydroxyl im alkoholischen Teil steht. Auch Chlorogensäure ist gegenüber älteren Angaben unspaltbar. Dagegen spaltet die „Pilz-Esterase" gerade die Ester ohne phenolisches Hydroxyl; damit ist die alte Frage, ob Beziehungen zwischen der „Salolase" (§ 268) und der Tannase bestehen, endlich geklärt. Nach diesen Angaben scheint aber auch, nach der Wirkung bemessen, das Enzym der Flechten von der echten Tannase verschieden zu sein, da es gerade die Orthostellung der phenolischen Hydroxyle braucht (s. u.).

Synthetische Wirkung. Der Abbau des Glucotannins muß über m-Digallussäure verlaufen, die dann durch Tannase weiter in Gallussäure zerlegt wird. Dieser letzte Teil des Abbaus ist durch Präparate aus *Asp. niger* z. T. rückgängig zu machen: es entsteht aus Gallussäure zu etwa 15 % m-Digallussäure **(60)**.

Da auch die sehr zahlreichen Säuren der Flechten **61)** Didepside oder Tridepside sind, so lag die Wahrscheinlichkeit nahe, daß sie durch Tannase oder ähnliche Enzyme gespalten werden. Es handelt sich um Depsidbildungen zwischen verschiedenen Phenolsäuren der Resorcingruppe, hauptsächlich der Orsellinsäure (Orcincarbonsäure), sowie einiger ähnlich strukturierter Säuren. Als einfachster Typus der Flechtensäuren sei hier nur als Didepsid der Orsellinsäure die Lecanorsäure angeführt.

CH_3 CH_3

$HO\langle\quad\rangle CO \cdot O \cdot \langle\quad\rangle COOH$

OH OH

Wenn man diese komplizierten Säuren, wie dies Koller **62)** tut, als Reservestoffe (Kohlenstoffreserven für den Fall mangelhafter Assimilation durch die Algen) betrachtet, so müssen die Flechten auch Enzyme führen, welche diese Depside zerlegen. Koller hat in einigen Vorversuchen solche Enzyme gefunden. Asahina **63)** hat dies insofern bestätigt, als er die Spaltbarkeit einer großen Reihe natürlicher Flechtendepside durch die Tannase aus *Aspergillus* (*niger* und *oryzae*) nachgewiesen hat. Am leichtesten werden diejenigen gespalten, bei denen ein freies OH zur Carboxylgruppe der Depsidbindung in ortho- oder meta-Stellung steht (Typus Lecanorsäure). Genauere Untersuchungen, ob wirklich Tannase in den Flechten selbst vorkommt, liegen noch nicht vor.

Auch unter den Schimmelpilzen ist die Fähigkeit, Tannin zu spalten und als C-Quelle zu verwerten, nach Rippel **64)** eng begrenzt auf *Aspergillus, Citromyces* und *Penicillium*. Auf Tannin-Nährböden mit Tannin als einziger C-Quelle wuchs sonst kein Pilz und kein Bakterium.

In Zellen höherer Pflanzen und Tiere ist T. noch nicht beobachtet worden.

---

60) ***M. Nierenstein,*** Biol. synth. of m-digallic acid. Biochem. Jl. **26,** 1093 (1932). — 61) ***Y. Asahina,*** Flechtensäuren. Tab. Biolog. Period. (W. Junk). Bd. X S. 198 (1934) (Vollständ. Zusammenstellg.). — 62) ***Georg Koller, G. Pfeiffer,*** Enzyme der Flechten. Monh. Chem. **62,** 359 (1933). — 63) ***Y. Asahina, T. Higuti,*** Enzymat. Spalt. der Flechten-Depside. Ber. Chem. Ges. **66,** 1959 (1933). — 64) ***A. Rippel, J. Keseling,*** Tanninzers. Mikroorg. Arch. für Mikrobiol. **1,** 60 (1930). BPh **56,** 380.

II. Chlorophyllase.

§ 282. Über dies im H.W. S. 514 (§ 288) behandelte Enzym ist seither kaum etwas Genaueres bekannt geworden. Über Darstellung und Wirkungsmessung hat sein Entdecker WILLSTÄTTER selbst im H. W. Bd. III, S. 739 berichtet. Davon sei hier nur — weil sonst nicht veröffentlicht — wiederholt, daß durch Dialyse das Ferment im Blattpulver völlig inaktiviert wird; durch $CaCl_2$ kann die Wirkung völlig wiederhergestellt werden.

Seither ist mir nur eine Abhandlung bekannt geworden, die sich mit dem Ferment näher beschäftigt, die bei NOACK ausgeführte Dissertation von MAYER **65)**. Neben einigen Verbesserungen der Herstellung von Enzympräparaten, der Messung etc. hat MAYER versucht, ein ph-Optimum zu finden: es blieb indessen bei Anwendung von Blattpulver die Wirkung gleich stark zwischen 2,5 und 8,8. Die Sachlage änderte sich aber, nachdem es ihm — nach einem Verfahren von NOACK **66)** — gelungen war, die enzymreichen Chloroplasten von dem sonstigen Blattmaterial zu trennen. Durch Fällung dieser Chloroplastenmasse mit Aceton erhält man ein Enzym-Trockenpräparat, das durch Aceton vom Chlorophyll befreit werden kann.

Beispiel für die Darstellung eines Enzympräparates: 500 frische *Heracleum*-Blätter wurden mit Sand unter allmählichem Zusatz von 1,5 l Wasser in der Porzellanmühle fein zerrieben, das Reibgemisch zur Entfernung der Gewebebruchstücke und des Sandes in mehreren Fraktionen je 5 Minuten lang bei hoher Tourenzahl zentrifugiert und die Flüssigkeit vom Sediment abgegossen. Hierauf wurden die vereinigten Fraktionen in einem Dekantiergefäß unter Umrühren allmählich mit dem doppelten Volum Aceton versetzt. Nach dem Absetzen des entstandenen Niederschlags wurde dekantiert, der Niederschlag in der Nutsche auf einem Hartfilter gesammelt und mit wasserfreiem Aceton so lange extrahiert, bis die ablaufende Flüssigkeit nicht mehr gefärbt war. Das Präparat wurde im Vakuumexsikkator getrocknet und kam sogleich zur Verwendung. Die Ausbeute betrug etwa 15 g.

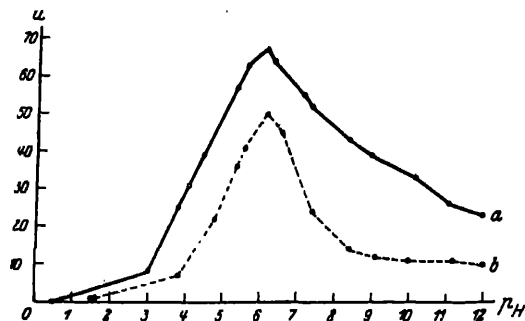



Abb. 6.
ph-Aktivitätskurve der Chlorophyllase für Chl. a und b nach MAYER.

Mit Hilfe dieses Präparates läßt sich nun ein scharfes ph-Optimum bei 5,9 finden, wenn man das natürliche Gemisch der Chlorophylle a und b anwendet. Für die beiden Chlorophylle getrennt zeigt sich dasselbe Optimum, aber ein etwas anderer Verlauf der Kurve auf der alkalischen Seite (Abb. 6); die praktische Unabhängigkeit der Wirkung von 9—12 ist noch nicht erklärt. Es zeigt sich ferner, daß bei jedem ph Chlorophyll a schneller zerlegt wird als b.

Ebenso wie die Chlorophylle und in demselben Verhältnis werden auch die nach Entfernung des komplex gebundenen Magnesiums mit Säuren erhaltenen Phaeophytine zerlegt; auch die „allomerisierten" Chlorophylle werden an sich viel langsamer, aber wieder a>b, zerlegt. Die NOACKsche Vorstufe, das Proto-Chlorophyll, wird nicht angegriffen.

---

65) ***H. Mayer,*** Chlorophyllase. Diss. Erlangen (NOACK). Planta **11**, H. 2 (1930). S.A. — 66) ***K. Noack,*** Zustand des Chlorophylls in d. leb. Pflanze. Bioch. Zs. **183**, 135 (142) (1927).

Abgeschlossen: 25. Mai 1935. Ber. Phys. 84, H. 7/8.

Die von WILLSTÄTTER (s. o.) gefundene Aktivierung durch Ca^{++} wird bestätigt; es wirken aber auch andere Elektrolyte aktivierend oder hemmend:

Aktivierend: alle Alkali- und Erdalkalichloride, $MgCl_2$, desgl. Nitrate, schwächer $ZnSO_4$, $FeSO_4$.

Hemmend: $CuSO_4$; KCN nur dann, wenn die meisten anderen Elektrolyte ausgewaschen sind.

Temperatur: 60° wirken in 10 Minuten beträchtlich schädigend, auch auf das Enzym im Blatt. Bei gewöhnlicher Temp. in Wasser Abnahme des Enzyms im Blatt nach 72 h.

Das Ferment findet sich überall, aber, wie schon WILLSTÄTTER feststellte, in einer seltsamen Verschiedenheit der Intensität, die nach MAYER weder systematisch noch ökologisch in eine Ordnung zu bringen ist. Arm sind alle Monokotylen und alle tropischen Gewächse (ausführliche Tabelle).

Die Werte für 1 g Blattpulver schwanken von 2 (*Avena, Cucurbita*) bis 90 (*Heracleum*). Höchstwerte im Mai und September (Bildung und Abbau von Chlorophyll), die aber auch bei der immergrünen *Hedera helix* gefunden wurden. Junge Blätter in gleicher Jahreszeit mehr als ältere. Abnahme bei der herbstlichen Verfärbung. Auch die weissen Teile panaschierter Blätter enthalten das Enzym, bei *Heracleum* und *Lamium* auch die Wurzeln. Dunkelpflanzen enthalten wenig Enzym.

D. Phosphatasen.

ALLGEMEINES.

§ 283. Diese Gruppe von Fermenten hat in letzter Zeit eine biologisch so außerordentlich große Bedeutung erlangt, und die diesbezügl. Literatur ist so angewachsen, daß es notwendig geworden ist, ihr einen Platz als eigene Sondergruppe einzuräumen, anstatt sie wie im HW. (§ 289) als eine Gruppe der „Sonstigen Esterasen" zu führen. Es handelt sich hier in erster Linie um Enzyme, welche die an eine Hydroxylgruppe, also esterartig gebundene Phosphorsäure aus organischen Verbindungen abspalten; in zweiter Linie um die Aufspaltung von Pyrophosphaten (s. u.). Es gibt auch noch eine verwandte Gruppe von chemischen Körpern, die Phosphorsäure gebunden halten an eine Aminogruppe, also Phosphamide mit der Bindung P-N sind, nämlich die Kreatin-PhS und Verwandte; auch diese werden in der Zelle erzeugt und gespalten, wobei Enzyme mitwirken. Aber diese Reaktion ist keine einfache Hydrolyse, sondern eine gekoppelte Reaktion (LOHMANN, § 284); die dabei wirksamen Fermente sind noch sehr wenig untersucht; nach WALDSCHMIDT-LEITZ 1) und ICHIHARA 2) sind sie spezifisch und von den Phosphatasen verschieden. Wir werden sie im Anschluß an die die Bindung C-N lösenden Amidasen als Untergruppe Phosphamidasen behandeln. Die eigentlichen Phosphatasen gehören also jedenfalls nach ihrem Substrat, der Esterbindung zwischen alkoholischen Hydroxylen und dem Sauerstoff der Phosphorsäure, zu den Esterasen im weitesten Sinne, deshalb ist für sie der Name Phospho-Esterase angemessen, der neuerdings gebräuchlich wird. Ihre Spezifitätsprobleme bieten noch viele grundsätzliche Unklarheiten, und zwar noch über die uns ja nunmehr genügend bekannten allgemeinen Probleme hinaus, wie sie die „Lipasen" aufweisen. Dabei wollen wir die Lösung der Grundfrage der Spezifität als endgiltig betrachten, daß nämlich die Phosphatasen mit ihrer ausgedehnten Spezifitätsgrenze nicht einfach die üblichen Esterasen an sich, d. h. nach unserer Nomenklatur „Lipasen" sind, sondern eigene Enzyme. Auch die präparative Trennung scheint mir nunmehr gesichert zu sein, nachdem BAMANN u. DIEDERICHS (l. c. 10a) aus dem Gemisch heraus die Esterasen durch n/1 Essigsäure zerstören konnten. Grundsätzlich handelt es sich immer wieder um dieselbe Entscheidung: wir haben ja auch bei den Lipasen allerlei solche Unterschiede gefunden, und somit die Frage ventiliren müssen, ob hier Fermente verschiedenen Baus vorliegen, oder ob auch bei diesen auffallenden Verschiebungen nur Einflüsse der Begleitstoffe im natürlichen Milieu resp. sogar noch in gereinigten Präparaten verantwortlich zu machen sind. Wir haben das letztere unserer Darstellung zu grunde gelegt und alle diese Unterschiede im Rahmen einer einheitlichen Schilderung der Lipasen als Gruppe gewürdigt. Dies scheint zum mindesten vorläufig auch bei den Phosphatasen die einzige Möglichkeit.

Es erscheint mir verfrüht, wenn die Schule AKAMATSU's (z. B. UZAWA 4)) aus den Unterschieden im opt. ph etc. nun drei verschiedene Fermentgruppen schon

1) ***E. Waldschmidt-Leitz, F. Köhler,*** Spez. der Nierenphosphatase. Bioch. Zs. **258,** 360 (1933). S.A. — 2) ***M. Ichihara,*** Phosphamidase. Jl. of Biochem. **18,** 87 (1933). S.A. — 3) ***R. Robison, K. M. Soames,*** Phosph. esterase of ossif. cartil. Biochem. Jl. **18,** 740 (1924). S.A. — 4) ***S. Uzawa,*** Kleien-phosphoesterase I, II. Jl. of Biochem. **15,** 1, 11 (1932). S.A —

unter den gleichwirkenden Phosphatasen trennen will, und an der Hand dieser Zahlen (ca. 3, 5,5 und 9) Analogien festlegt zwischen diesen Fermenten und den drei tragenden Gruppen der Proteasen mit ihren ähnlichen Optima (Pepsinasen, Papainasen, Tryptasen), sowie ferner bereits die Physikochemie dieser drei Gruppen in Hinsicht auf ihre Ladung etc. wie bei den Proteasen diskutirt, z. B. Dissociationskonstanten ausrechnet (ASAKAWA 5), INOUYE 6)). Für solche weitgehenden Analogieschlüsse wissen wir von den Ph. als Fermente noch zu wenig. Man wird diese Befunde als sehr interessante und wichtige Momente der Diskussion vormerken; aber vorläufig haben wir von diesem Standpunkte aus noch zum mindesten das Recht, die Ph. als eine Enzymgruppe auch deskriptiv-chemisch zu schildern.

Die präparative Trennung sowie Betrachtungen über die Spezifität sprechen dafür, daß die Phosphatasen als selbständige Gruppe zu bewerten sind; wir wollen uns also an dieser Stelle mit der Feststellung von ROBISON 3) begnügen, daß die sehr wirksame Knochenphosphatase Olivenöl und Lecithin nicht angreift, und daß die nebenbei gefundene Wirkung auf einfachere Ester eben einer geringfügigen Beimischung von allgemeiner „Lipase" zuzuschreiben ist. Nur diese Annahme gibt ja uns überhaupt nun das Recht, ein Kapitel „Phosphatasen" abzugrenzen, und die vielseitigen und wichtigen Erscheinungsformen dieser Fermente und ihrer Wirkungen gesondert zu beschreiben. Auch von den Sulfatasen sind sie augenscheinlich verschieden nach opt. ph, Wirkung von Aktivatoren und Hemmern, Vorkommen (HOMMERBERG, l. c. 18). Aber auch dann erheben sich noch zahlreiche ungelöste Fragen. Wir stehen vor zwei Hauptproblemen: erstens zeigen die Phosphatasen verschiedener Herkunft unter sich auffallende Verschiedenheiten bei gleicher Wirkung, und zweitens sind die Grenzen der Spezifität noch nicht widerspruchsfrei zu präzisiren, wir wissen im Allgemeinen immer noch nicht, ob es, nach der Wirkung bemessen, nur wenige spezifische Ph. gibt, oder eine ganze Reihe. Und endlich kombiniren sich beide Fragen dahingehend, ob nicht etwa die in der Wirkung verschiedenen spezifischen Enzyme auch verschiedene Natur besitzen.

Was die erste Frage anlangt, so werden wir sie § 288 ff. genauer behandeln: es liegen außerordentliche Verschiedenheiten im optimalen ph, in der Aktivirung und Hemmung (durch Mg, Arsenate, Fluoride etc.) vor, die der Erklärung harren; außerdem werden Verfahren zur präparativen Trennung verschiedener Typen von Ph. angegeben, deren Nachprüfung ungemein wichtig wäre.

Was durch die Arbeiten der AKAMATSU-Schule nunmehr neben manchen fraglichen Einzelangaben, auf die wir mehrfach zurückkommen werden, sowie durch systematische Untersuchungen von BAMANN c.s. 8—10) mit moderner Methodik nach WILLSTÄTTER feststeht, ist Folgendes:

Es gibt unter den „gewöhnlichen" Phosphatasen mit Wirkung auf β-Glycerophosphat — von den wahrscheinlich vorhandenen Spezialfermenten sehen wir vorerst einmal ganz ab — drei Typen, die sich nach dem opt. ph im Rohextrakt auf den ersten Blick ebenso scharf unterscheiden, wie die Magenlipasen von der des Pankreas.

1) eine mit extrem saurem ph von 2,8, repräsentirt durch die Takaphosphatase

5) ***K. Asakawa***, Nierenglycerophosphatase. Jl. of Biochem. **10**, 157 (1928). S.A. — 6) ***K. Inouye***, ph-Abhäng. der Glycerophosphatase. Jl. of Biochem. **10**, 133 (1928). S.A. — 8) ***E. Bamann, E. Riedel***, Vork. zweier ... Phospho-esterasen in tier. Organen. Zs. phys. Chem. **229**, 125 (1934). S.A. — 9) ***E. Bamann, E. Riedel, K. Diederichs***, Freilegung der Phosph. aus der Leber. Zs. phys. Chem. **230**, 175 (1935). S.A. — 10) ***E. Bamann, K. Diederichs***, Trenn. der beiden isodynamen Phospho-ester. Ber. Chem. Ges. **67**, 2019. — 10a) ***Dies.***, Abtrenn. der begleit. Esterase ... von der Leberphosph. ebd. **68**, 6 (1935), S.A.

von *Aspergillus Oryzae* (INOUYE 6)) und die aus dem Hepatopankreas von *Helix* (KARRER 11)). Ein sehr ähnliches Enzym fanden aber kürzlich H. und E. ALBERS **11a)** in Hefen, besonders Oberhefen. Die Angabe von ASAKAWA **12)**, daß dasselbe auch in Warmblütergeweben vorkommt, wird von BAMANN bestritten. Näheres und weitere Literatur § 289. Es ist aber zweifelhaft, ob dies ein besonderer Enzymtypus ist, denn nach ASAKAWA **12)** gilt dieser stark saure ph nur für die Spaltung von Estern sekundärer Alkohole als Optimum, z. B. für β-Glycerol-PhS, Isopropyl-PhS etc., nach ALBERS auch für Zymophosphat, während die α-Ester auch von Taka bei 5,6 optimal gespalten werden. Es scheint also die Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substratverbindung dieses Optimum zu bedingen, nicht ein besonderes Enzym. Jedenfalls ist dieser Typus im Gegensatz zu den Angaben von ASAKAWA, HORI, MUNEMURA etc. (§ 289) von BAMANN in Geweben höherer Tiere nicht gefunden worden; KLEIN (l. c. 28b) fand eine Ph. mit opt. ph von 4,0 in Leber, Niere und Darm; hierzu wohl auch die auch sonst abweichende Ph. der Milz von DAVIES (l. c. 68a). Dagegen gibt es zwei zweifellose Unterarten:

2) eine mit einem ph-Opt. von 5—6. Diese ist von UZAWA **4)** in Reiskleie, von ROCHE (l. c. 20) und exakter von HORI **13)** in Erythrocyten gefunden worden, kommt aber nach BAMANN auch in anderen Geweben vor; nach ASAKAWA **12)** für α-Ester auch in der Taka. BELFANTI c. s. **13a)** fanden sie in Leber und Niere, sehr schwach in Knochen und Blutserum; im Knochen scheint sie vorhanden, aber durch Fluoride gehemmt zu sein. Auch eine Ph. der Hefe gehört zu dieser Gruppe (l. c. 28a).

3) die bei höheren Tieren allgemein vorkommende eigentliche Gewebsphosphatase mit einem opt. ph von ca. 9. Sie soll nach BELFANTI c.s. **13a)** in 2 verschiedenen Typen auftreten: die Ph. aus Knochen und Blutserum wird durch Oxalate teilweise gehemmt, die aus Leber und Niere nicht; die erstere ist ferner viel empfindlicher gegen saure Reaktion.

Wir müssen also für tierische Organe davon ausgehen, daß zunächst einmal zwei Typen von Ph. existiren, die ihre Optima bei 5—6 und ca. 9 haben. Das dazwischen liegende Minimum ist sowohl im rohen wie im dialysirten Extrakt vorhanden (im gereinigten Enzym etwas nach alkalisch verschoben, von ca. 7,0 nach 7,8), so daß jedenfalls die beiden Maxima bedingt sind nicht durch ganz lose anhängende Begleitstoffe, sondern auf verschiedenen Fermentsystemen im weiteren Sinne beruhen. Dafür spricht ferner, daß Mg die „saure" Ph. nicht aktivirt. Ferner lassen sich beide Enzyme präparativ trennen **(10)**; die „alkalische" Ph. ist bei saurer Reaktion unbeständig, die „saure" bleibt bestehen, und umgekehrt läßt sich durch n/20 NH_3 die „saure" inaktiviren (§ 288). Die Sache hat nun eine eigenartige Wendung genommen insofern als nach WALDSCHMIDT-LEITZ **14)** das „saure" Enzym das der roten Blutkörper allein sein soll, und mit oder aus diesen in die Gewebe und in den Harn übergeht, während das eigtl. Gewebsferment die „alkalische" Ph. ist. Die saure Ph. ist dann wohl mit der pflanzlichen (Reiskleie) und der der Mikroben (Taka, Hefe) gruppenidentisch. Es liegen hier also zweifellos zwei isodyname, aber verschiedene Enzymabarten vor.

Ein völlig anderes Problem sind die **Spezifitätsgrenzen der Phosphatasen** in bezug auf ihre Wirkungen. Hier haben die Anschauungen stark gewechselt, und auch heute

11) ***P. Karrer***, Enz. Spalt. der Glyc.-PhS. Festschr. A. TSCHIRCH 1926, 421. — 11a) ***H.* u. *E. Albers***, Hefenphosphatase. Ark. för Kemi 12 B. Nr. 3 (1935). S.A. — 12) ***K. Asakawa***, Ferm. Spalt. der versch. PhS-Ester. Jl. of Biochem. **11**, 143 (1929). S.A. — 13) ***W. Hori***, Phosphoesterase. Jl. of Biochem. **16**, 433 (1932). S.A. — 13a) ***S. Belfanti, A. Contardi, A. Ercoli***, Phosphatases I, II. Biochem. Jl. **29**, 517, 842 (1935) S.A. — 14) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Nonnenbruch***, Phosphatasen im Blut. Naturw. **1935**, 164.

noch ist ziemlich Alles im Fluß. Während man anfangs ohne viel Kritik für jede Gruppe von Estern zunächst der Phosphorsäure selbst („Ortho-phosphorsäure" H_3PO_4) eine eigene Phosphatase supponirte, geht die allgemeine Tendenz dahin, von einigen wenigen Ausnahmen abgesehen, (und ohne Berücksichtigung der „isodynamen" Typen), nur eine einzige überall verbreitete Ph. mit sehr weiten Spezifitätsgrenzen anzunehmen.

Wie wir in den folgenden Abschnitten im Einzelnen ausführen werden, sind die Wirkungen der Ph. ungemein ausgedehnt. Sie zerlegen alle möglichen einfachen Ester der Phosphorsäure und Pyro-PhS, auch anorganische Salze der Pyro-phosphorsäure unter Aufsprengung der Sauerstoffbrücke; ihre wesentlichen biochemischen Substrate sind die PhS-Ester des Glycerols frei und in Bindung an Cholin, ferner die Serin-PhS in den Phosphorproteinen resp. daraus gewonnenen Polypeptiden, sowie endlich alle Arten von PhS-Estern der Kohlenhydrate, sowohl in den natürlichen Nucleotiden, wie in den biochemisch entstehenden oder synthetisch gewonnenen Zuckerphosphaten, in der Amylose-PhS des Amylopectins und Glykogens, den PhS-Estern der Zuckerabbauprodukte, und endlich im Phytin, dem Hexa-PhS-Ester des inaktiven Inosits.

Es fragt sich also, wieviele Enzyme hier am Werke sind. Als sicher verschieden durch Vorkommen und Verhalten löst sich die **Phytase** ab, die wir demgemäß getrennt behandeln wollen (§ 294). Alle anderen werden wir vorläufig unter dem gemeinsamen Stichwort Phosphatasen behandeln. Wir gehen hier bewußt denselben Weg wie bei den Lipasen, indem wir zwar selbstverständlich an jeder gegebenen Stelle auf die Verschiebungen der Wirkung hinweisen, aber doch eben von der Annahme ausgehen, daß hier keine völlig verschiedenen Fermente, sondern irgendwie verschiedene Gesamtsysteme, d. h. eigentliches Fermentsystem + Begleitstoffe vorliegen, welche die Erscheinungen der „relativen Spezifität" herbeiführen. Es spricht dafür wie bei den Lipasen als Hauptargument eben der Umstand, daß die Grenzen allzu fließend sind, und daß man im anderen Falle genötigt wäre, unzählige Sonderfermente anzunehmen, noch dazu solche, die auf unphysiologische Substrate wirken.

Um nicht wiederholen zu müssen, seien folgende Hauptgesichtspunkte vorangestellt. Es herrscht ziemliche Einmütigkeit darin, alle auf einfache Ester der PhS ausgeübten Wirkungen einem einzigen Enzym zuzuschreiben, es gibt also keine besondere Glycerophosphatase oder Zuckerphosphatase mehr (KAY **15—17**), HOMMERBERG **18**), WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 1) u.a.). Dies gilt auch für die Pentose-Ester in den Nucleotiden; wenn wir diese enzymatischen Spaltungen hier nicht genauer behandeln, so hat dies den ganz äußerlichen Grund, daß sie allzu eng eingebettet sind in den gesamten Abbau der Nucleinsäuren, so daß wir sie alle gemeinsam im Kap. „Nucleasen" (§§ 425 ff) behandeln werden.

Folgende Einzelfragen stehen zur Diskussion:

1) es hat sich fast allgemein die Ansicht durchgesetzt, daß das Enzym, welches die Adenylpyrophosphorsäure LOHMANNS zerlegt, eine völlig spezifische „**Adenylpyrophosphatase**" ist; jedoch wird dem neuerdings von SATOH **18a**) widersprochen, der diese Wirkung einem Gemisch von Pyrophosphatase mit Phospho-Esterasen zuschreibt (Näh. § 294).

---

15) ***H. D. Kay,*** Kidney phosphatase. Biochem. Jl. **20**, 791 (1926). S.A. — 16) ***H. D. Kay,*** Phosphatase of mammal. tissues., Biochem. Jl. **22**, 855 (1928). S.A. — 17) ***H. D. Kay,*** Plasma phosph. Jl. of Biol. Chem. **89**, 235, 249; **91**, 135 (1930/1). S.A. — 18) ***Cl. Hommerberg,*** Spec. der Phosphatasen. Zs. phys. Chem. **185**, 123 (1929); **200**, 69 (1931). — 18a) ***T. Satoh,*** Hydrol. der Adenosin-triphosphors. etc. Jl. of Biochem. **21**, 19 (1935). S.A.

2) Adenylpyrophosphatase greift andere Pyrophosphate nicht an; man hat also bisher meist angenommen, daß solche Pyrophosphate von der allgemeinen unspezifischen Phosphatase zerlegt werden. Indessen ist es nicht unwahrscheinlich, daß die Aufspaltung der Sauerstoffbrücke in den — anorganischen und organischen — Pyrophosphaten das Werk besonderer Enzyme ist. Gegen die Identität von gewöhnlicher Phosphatase und einer spezifischen „**Pyrophosphatase**" haben zuerst KAY **19)** (wegen gefundener ph-Differenzen, 7,6 gegen 8,8) und ROCHE **20)** (wegen verschiedener Verteilung) Bedenken geäußert, die nun durch die Schule AKAMATSU zu einer Verkündung nicht nur einer, sondern mehrerer spezifischer Pyrophosphatasen geführt haben. Sie sollen in denselben drei Gruppen mit den verschiedenen ph-Optima auftreten, wie die gewöhnlichen Phosphatasen. Nach ihren Angaben ist es gelungen, sowohl die „saure" (KURATA **21)**), wie die „alkalische" Pyroph. (TAKAHASHI **22)**) von den entspr. „**Phospho-Esterasen**" durch auswählende Adsorption zu trennen und wirkungsrein darzustellen (§ 288), vgl. auch die Übersicht § 289.

Aber auch die Phospho-esterasen sind nach den Angaben der japanischen Forscher nicht einheitlich. Zwar scheinen nach KOBAYASHI **23)** auch die Ester mit mehreren PhS-Gruppen, wie z. B. Diphosphoglycerinsäure oder Resorcin-di-PhS (MANAKA **24)** von derselben Enzymgruppe zerlegt zu werden, und nur die Phytase ein eigenes Enzym zu sein. Dies ist wichtig für die Zerlegung der Fructose-di-PhS (s. u. und § 286). Dagegen behauptet UZAWA **25)**, daß es eine eigene **Phospho-diesterase** gibt, die aus Estern vom Typus Diphenyl-PhS nur eine Phenolgruppe abspaltet, ohne PhS freizusetzen.

Sein Hauptargument ist, daß das Gift der Habu-Schlange (*Trimeresurus flavoviridis*) ausschließlich derart auf Diphenyl-PhS wirkt, und zwar am besten bei ph = 8,6, daß ein Phenol frei wird, ohne daß PhS abgespalten wird. Dieses Vorkommen im Schlangengift mit seinen „Lecithasen" (§ 280) ist nun insofern interessant, als auch hier ein „Di-ester" der PhS vorkommt, nämlich der Komplex Glycerol-PhS-Cholin, der durch die „Lecithase B" freigesetzt wird. Wie dieser Komplex gespalten wird, ist nun noch nicht klar. Es kann dasselbe Enzym, eine einfache Phosphatase, die Bindung sowohl zwischen der PhS und dem Glycerol, wie zwischen der PhS und dem Cholin lösen; es kann aber auch ein besonderes Enzym die Spaltung zwischen dem Cholin und der PhS zuerst bewirken, während dann die gewöhnliche Phosphatase die Bindung der Glycerol-PhS löst. Dieses „besondere" Enzym, eine „**Cholin-Phosphatase**" (vgl. a. § 285) wird tatsächlich von der Schule BELFANTI, z. B. CONTARDI **26)** angenommen. Hier handelte es sich dann auch um eine Di-Esterase, die also nur Cholin abspalten, dagegen keine PhS freisetzen würde, und so wächst diese Ansicht mit der von UZAWA zusammen, der nun seine Di-Esterase auch gerade im Schlangengift fand, neben dem Habugift auch in *Ancistrodon blomhoffi*.

In der Tat teilt mir H. Prof. AKAMATSU brieflich mit, daß nach seinen Befunden diese

---

19) ***H. D. Kay***, Pyrophosphatase. Biochem. Jl. **22**, 1446 (1928). S.A. — 20) ***J. Roche***, Blood-phosphatase. Biochem. Jl. **25**, 1724 (1931). S.A. — 21) ***K. Kurata***, Spalt. der Diphenylpyrophosphors. Jl. of Biochem. **14**, 25 (1931). S.A. — 22) ***H. Takahashi***, Pyrophosphatase etc. Jl. of Biochem. **16**, 447 (1932). S.A. — 23) ***H. Kobayashi***, Ferm. Spalt. der Diphospho-glycerins. Jl. of Biochem. **11**, 173 (1929). S.A. — 24) ***Ch. Manaka***, Ferm. Hydrol. der verschied. PhS-Ester etc. Jl. of Biochem. **14**, 191 (1931). S.A. — 25) ***S. Uzawa***, Phospho-monoesterase und Phospho-diesterase. Jl. of Biochem. **15**, 19 (1932). S.A. — 26) ***A. Contardi, A. Ercoli***, Enz. Spalt. der Lecith. Bioch. Zs. **261**, 275 (1933). S.A.

Di-Esterase des Schlangengiftes die gesuchte Cholin-Phosphatase ist, daß es aber in seinem Institut UDAGAWA 27) gelungen ist, eine andere Di-Esterase, die Glycerol-PhS-Cholin unter Freisetzung von Glycerol und Cholin-PhS zerlegt, aus der Taka zu isoliren; nach HOTTA 28) kommt diese letztere auch in Warmblütergeweben vor, ist aber noch nicht wirkungsrein isolirt. Eine Bestätigung dieser Angaben einer effektiven Isolirung einer besonderen Enzymgruppe für Di-Ester der PhS würde also wiederum eine Bresche in die einheitliche Auffassung der Phosphatasen schlagen; eine Ergänzung im Negativen dazu ist die Angabe von SCHÄFFNER 28a), daß Hefenph. Di-Ester überhaupt nicht angreift. Eine Di-Esterase soll es nach TAKAHASHI auch sein, die in Gemeinschaft mit einer Mono-Esterase die Nucleinsäure angreift, also die „Polynucleotidase" bildet (§ 284).

Im übrigen fand HOTTA 28) für die Spaltung verschiedener kombinirter Di-Ester sehr verwickelte Verhältnisse. Ein Teil der Di-Ester wird nur durch die Mono-Esterase allein gespalten, wenn nämlich Alkohole von verschiedenem Typus gegeben sind (primäre, resp. Phenol auf der einen Seite, sekundäre oder alicyclische auf der anderen), z. B. sek.-Butyl-PhS-phenylester; dagegen wirkt nur die Di-Esterase, wenn beide Alkohole denselben Typus haben, wie eben Diphenyl-PhS, oder Di-sek.-Butyl-PhS oder Di-cyclohexanol-PhS; auf die Di-Ester der ersten Art ist die Di-Esterase ohne Wirkung. Diese sehr seltsamen Zusammenhänge bedürfen dringend einer Nachprüfung (vg. a. § 285). Bisher liegt eine solche nur von W. KLEIN 28b) vor; er konnte die Existenz einer besonderen Di-Esterase in keinem Fall bestätigen; auch das Habugift zerlegte Mono- und Diphenylphosphat mit gleicher Geschwindigkeit, ebenso Hefennucleinsäure. Andererseits haben zwar CONTARDI c. s. 28c) den Angriff der Hefennucleinsäure durch eine Di-Esterase im Sinne TAKAHASHI's bestätigt, aber dieser erfolgt auch durch Präparate, welche die Cholin-phosphatase nicht enthalten, so dass sie jeden Zusammenhang zwischen diesem Spezialferment und der Di-Esterase der japanischen Forscher ablehnen. (§ 285).

Schließlich ist noch die Frage aufgeworfen worden, ob es nicht zwei verschiedene Ph. in dem Sinne gibt, daß die eine die Ester der PhS mit primären Alkoholen, die andere mit sekundären Estern besser oder praktisch ausschließlich spaltet. Es ist dafür bei den synthetischen Estern etwas Material angegeben worden (§ 287); vor Allem aber ist die Frage für die Glycerol-PhS wichtig, ob nämlich α- und β-Glycerol-PhS durch verschiedene Enzyme gespalten werden. Wir kommen darauf §§ 285, 289 zurück; es wird für die tierischen Ph. angegeben, daß die „saure" mehr auf α, die alkalische mehr auf β eingestellt ist, mit alleiniger Ausnahme der bei ph = 6 wirksamen Ph. der Milz (DAVIES, l. c. 68a), die β dreimal schneller als α spaltet. Eine fast absolute Spezifität gibt nur für die bei ph = 6 optimal wirkende Hefenph. SCHÄFFNER 28a) an, da sie praktisch nur α-Glycerol-PhS spaltet, β sehr wenig, noch weniger Di-Ester, und auch Zuckerphosphate nur träge angreift (s. u.); wie denn allgemein die Spaltung der Zuckerphosphate stets ungefähr der von β-Glycerol-PhS parallel geht. Dagegen wirkt die andere Hefenph. (l. c. 11a) besser auf β-Glycerol-PhS bei ph von ca. 4,0, entspricht also dem Typus der DAVIESschen Milzphosphatase.

Endlich liegt noch eine gewisse Unklarheit beim Fructose-di-phosphat (HARDEN-YOUNG-Ester) vor. Dieser wird zwar stets zunächst asymmetrisch gespalten, d. h. nur eine PhS-Gruppe entfernt, aber durch verschiedene Enzympräparate entstehen verschiedene Monophosphat-Gemische. Es ist also möglich, daß für die Abspaltung der PhS in 6 eine andere Phosphatase am Werke ist als für die PhS in 1, wahrscheinlich aber wirkt auch hier die ganz allgemeine Phospho-esterase. Wir kommen § 286 darauf zurück. Ganz eigenartig liegt die Sache bei der

27) ***Udagawa,*** (Phosphatase); noch nicht public. — 28) ***R. Hotta,*** Spec. der Phosphatasen. Jl. of Biochem. **20,** 341 (1934). S.A. — 28a) ***A. Schäffner, E. Bauer,*** Hefephosphatase, Zs. phys. Chem. **232,** 66 (1935). — 28b) ***W. Klein, A. Rossi,*** Ferm. Unt. über den Aufbau des Polynucleotidmol. Zs. phys. Chem. **231,** 104 (1935). — 28c) ***C. A. Contardi, C. Ravazzoni,*** Sciss. enzym. de l'acide nucléin. etc. Arch. ital. Biol. **92,** 64 (1935) S.A.

Hefe. Hier gibt es zwei Typen von Ph. Die SCHÄFFNERsche (28a) greift wie erwähnt Zymophosphat nur sehr träge an, Hefenautolysate an sich aber kräftig. Nach ALBERS (l. c. 11a) gibt es nun in der Hefe eine zweite Ph. mit stark saurem Optimum, die auch an sich, frei von Dehydrasen, Zymophosphat energisch spaltet, eine besondere „Fructose-di-phosphatase".

Zur Übersicht sei hier eine Tabelle von ROCHE 20) wiedergegeben, welche die relative Wirkung verschiedener Enzyme auf eine Reihe von Substraten zeigt.

Eine weitgehende thematische Beschränkung unserer Darstellung bei den Zuckerphosphatasen muss noch hervorgehoben werden: die sehr gewichtige biologische Bedeutung dieser Enzyme im vitalen Abbau der Zucker kann hier nicht im Einzelnen behandelt werden, da sie unlösbar verknüpft ist mit den ungemein komplizirten und in vielen Punkten noch stark umstrittenen Problemen eben dieses Zuckerabbaus

Table III. *Hydrolysis of phosphoric esters by tissue phosphatases at their optimum* pH *and 38°* *(mg. P/100 cc. of enzyme solution).*

	Source of phosphatase					
	Red cells	White cells	Serum	Bone	Intestine	Kidney
Duration of hydrolysis (hrs.)	16	10	16	1·4	1	2
Substrate (sodium salts)						
α-Glycerophosphate	38·8	32·7	27·9	47·1	38·4	15·9
β-Glycerophosphate	11·2	53·4	36·43	69·0	44·4	24·9
Glucosemonophosphate	33·7	58·2	36·9	65·2	37·9	32·8
Fructosemonophosphate	47·1	66·7	44·4	60·4	48·4	40·5
Fructosediphosphate	45·0	67·4	47·2	51·4	47·4	42·4
Monoethylphosphate	12·2	21·0	17·4	16·1	21·3	10·2
Diethylphosphate	0·1	0·1	0·1	0·2	0·2	0·1
Monophenylphosphate	75·6	68·4	63·4	75·2	48·4	39·4
Monopropylphosphate	14·4	19·7	17·1	—	—	—
Dipropylphosphate	0·1	0·2	0·1	—	—	—
Adenylate	8·2	22·1	15·1	22·2	14·0	16·9
Guanylate	9·6	20·4	16·1	25·1	15·2	14·4
Trehalosemonophosphate	5·5	22·1	16·4	20·0	6·1	18·8
Diphosphoglycerate	8·7	17·4	13·7	14·0	9·1	13·3
Pyrophosphate	6·2	31·2	7·0	39·0	35·2	15·2

selbst. Es ist durchaus noch nicht sicher, ob irgend einer der uns bekannt gewordenen Phosphorsäure-Ester der Zucker überhaupt die wahre Zwischenstufe bei der Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Zucker ist, ob sie nicht vielleicht sämtlich erst bei der chemischen Präparation herausgefischte Stabilisirungsprodukte der verwickelten Gleichgewichtszustände des Zuckerabbaus sind (vgl. LOHMANN 29), 30)). Und wenn einer oder einige wahre Zwischenprodukte sind, so wissen wir noch nicht, welche, und somit wissen wir auch nicht, an welchen Substraten rein zellbiologisch gemessen, das oder die Enzyme angreifen. Wir können an dieser Stelle, was die Enzyme der Zuckerphosphate anlangt, nur rein deskriptiv vorgehen, d. h. wir können nur beschreiben, wie die Enzyme auf ihnen vorgelegte definirte Substrate wirken und daran anschließend, wie sich diese Enzyme verhalten, und wo und in welchen Variationen man sie findet.

Dieser Umstand, daß wir tatsächlich bisher nicht wissen, welche Substrate im echten biologischen Ablauf der Dephosphorylirung unterliegen, ist prinzipiell im Stande, bisher kaum verständliche Erscheinungen zu deuten. So wissen wir, daß im Tätigkeitsstoffwechsel des Muskels blitzschnelle sehr intensive Dephos-

---

29) ***K. Lohmann,*** Bild. und Aufspalt. von Ph-S-Estern etc. Bioch. Zs. **222**, 324 (1930). — 30) ***F. Lipmann, K. Lohmann,*** Umwandl. der HARDEN-YOUNG'schen Hexose-di-PhS. etc. Bioch. Zs. **222**, 389 (1930).

phorylirungen erfolgen müssen, die sehr aktive Enzyme gebieterisch verlangen. Und in Widerspruch dazu sind alle einfachen Phosphatase-Wirkungen an definirten Substraten im Muskelbrei auffallend schwach, der Muskel steht eigentlich immer bei vergleichenden Untersuchungen mit an letzter Stelle, wie schon TOMITA (*l. c. 454*) für Saccharose-PhS fand. Das kann natürlich besagen, daß der Muskel noch nicht bekannte, sehr labile und spezifische Phosphatasen enthält. Es kann aber auch wie gesagt bedeuten, daß alle reinen Substrate, die wir den Muskelphosphatasen vorsetzen, nicht mehr die maximal angepaßten Substrate sind und deswegen mit relativ kleiner Affinität gebunden, oder — was praktisch auf dasselbe hinausläuft — kleiner Zerfallsgeschwindigkeit zerlegt werden.

So wird z. B. Hexosediphosphat von Muskelextrakt bei Anwesenheit von Mg als Aktivator langsam in Monophosphat (zunächst den NEUBERG-Ester) zerlegt. Nähert man aber den Versuchsansatz dem natürlichen Zustand, indem man noch Adenyl-pyrophosphorsäure hinzufügt, so tritt eine sehr schnelle komplette PhS-Abspaltung ein, ohne daß Monophosphat entsteht; es gilt eben hier der ganz andere verwickelte Reaktionsablauf der Zuckerzerlegung — vom Zymophosphat aus gesehen — vor sich, bei dem nach MEYERHOF und LOHMANN **31)** die PhS-Abspaltung schließlich an einer Phospho-brenztraubensäure erfolgt (§ 286). Genau so liegt es bei der Adenyl-pyrophosphorsäure selbst. Sie wird im Muskel blitzschnell soweit dephosphorylirt, daß Ergadenylsäure entsteht, die aber gleichzeitig zu Inosinsäure desaminirt wird; die weitere Dephosphorylirung geschieht dann erst bei alkalischer Reaktion und sehr langsam. Also auch hier die Frage: ganz selbständige „Adenyl-Pyrophosphatase" oder schwache Affinität der Inosinsäure zu derselben Phosphatase im Milieu des Muskels? Diese Fragen sind bisher im gesamten Bereich der Phosphatasen grundsätzlich noch nicht zu beantworten; allerdings besteht gerade hier eine große Wahrscheinlichkeit für die Sonderexistenz einer Adenyl-Pyrophosphatase (§ 294).

I. Die Substrate und die Grenzen der Enzym-Spezifität.

§ 284. Biologisch in Betracht kommende echte Ester der Phosphorsäure, d. h. an Hydroxyle gebundene, kennen wir bisher als Abbaustufen von vier Gruppen der Zellstoffe. Es erhebt sich die Frage, ob und wieviele verschiedene Phosphatasen bei ihrer Zerlegung mitwirken.

1) **Polypeptide der Serin-Phosphorsäure** entstehen beim Abbau der Phosphorproteine. Serin ist die β-Oxy-aminopropionsäure $HO \cdot CH_2 \cdot CH{<}{}^{NH_2}_{COOH}$; an ihrer Hydroxylgruppe ist eine PhS gebunden **(32)**.

Diese Serin-PhS enthält wahrscheinlich den gesamten Phosphor des Caseins (LIPMANN **33)**), aber auch der Vitelline (LEVENE **34)**) und Ichthuline **35)**). Sie ist bei Casein in Polypeptiden mit Glutaminsäure, z. T. auch mit Leucin verkettet (LEVENE, SCHMIDT **36)**); durch Trypsin läßt sich nach RIMINGTON **37)** der ganze Komplex als Phosphopepton isoliren; damit haben alte nie geklärte Ansichten über Polypeptid-

31) ***O. Meyerhof, K. Lohmann,*** Enzym. Gleichgew. von Hexose-di-PhS etc. Bioch. Zs. **271,** 89, **273,** 60, 73 (1934). — 32) ***F. Lipmann, P. A. Levene,*** Serinephosphoric acid etc. Jl. of Biol. Chem. **98,** 109 (1932). — 33) ***F. Lipmann.*** Bind. der Phosphors. in Phosphorproteinen. Bioch. Zs. **262,** 3, 9 (1933). — 34) ***P. A. Levene, A. Schormüller,*** Serinephosph. acid etc. Jl. of Biol. Chem. **103,** 537 (1933). — 35) ***S. Posternak c.s.,*** Noyau phosphoré de l'ichtuline C.R. **197,** 429 (1933). — 36) ***G. Schmidt,*** Dipeptidphosphorsäure aus Casein. Zs. phys. Chem. **223,** 86 (1934). — 37) ***Cl. Rimington,*** Phosphoryl. of proteins. Biochem. Jl. **21,** 272, 1179, 1186 (1927).

phosphorsäuren („Paranucleine") ihre Bestätigung gefunden; freilich hatte man eigentlich immer an die Bindung von PhS an Aminogruppen gedacht (H. W. S. 835); darauf werden wir im XII. H. T. zurückkommen. Über die endgiltige Zerlegung dieser Polypeptide und die Frage, ob es etwa für die Spaltung der Serin-PhS ein eigenes Enzym gibt, fehlen noch direkte Versuche. Da Serin-PhS analog der Glycerinsäure-PhS ist (NH_3 anstatt OH am α-C), so kann man bis zum Beweis des Gegenteils annehmen, daß beide durch dieselbe Phosphatase zerlegt werden. Bekannt ist bisher nur, daß Trypsin schließlich die gesamte PhS freisetzt; es muß also entweder die allgemeine Phosphatase (Trypsin zerlegt ja auch Lecithin) oder die bisher nicht identificirte spezifische Serin-Phosphatase enthalten. Nach RIMINGTON **37a)** läßt sich aber auch mit Nierenphosphatase aus dem Phosphopepton die gesamte PhS leicht abspalten; (Knochenph. nur zu 67 %); es dürfte also wohl kein besonderes Enzym anzunehmen nötig sein. Caseinogen selbst wird garnicht angegriffen, auch nicht das durch Pepsin entstehende Paranuclein.

2) Die **Nucleotide** entstehen in der Hauptsache als erste Abbaustoffe aus den Polynucleotiden, d. h. den echten Nucleinsäuren. Je nachdem sie aus der sog. Hefennucleinsäure entstehen oder aus der nur in tierischen Geweben vorkommenden Thymonucleinsäure, enthalten sie den Phosphorsäure-Ester der d(—)Ribose oder der (—)Ribodesose (Thyminose), einer reducirten Pentose $HO \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CHO$. In allen Fällen ist die PhS an das C-Atom 3 des Zuckers gebunden. Die Basen sind Adenin, Guanin, Cytosin und (nur in der Thymonucleinsäure) Thymin, die ihrerseits an C_1 des Zuckers gebunden sind (Nucleoside). Auf alle diese Struktur- und Abbaufragen werden wir im Zusammenhang beim Kap. „Nucleasen" zurückkommen (§ 425 ff.) Es ist dies schon deswegen vorzuziehen, weil das Enzym, das die Bindung zwischen Zucker und PhS löst, kein spezifisches Ferment des Nucleinsäureabbaus ist, sondern die ganz allgemeine Phosphatase mit dem Vorbehalt einer noch nicht voll gesicherten relativen Spezifität, wie wir es oben diskutirt haben. Spezifisch sind wahrscheinlich die Nucleinasen, welche aus den Nucleinsäuren die Nucleotide bilden, und jedenfalls die Nucleosidasen, welche als Glykosidasen die Basen vom Zucker lösen. W. KLEIN **37b)** hat aus Darmschleimhaut eine Thymo-nucleinase gewonnen, die sich durch ihre Resistenz gegen Arsenat von der Ph. unterscheiden läßt; sie zerlegt Thymonucleinsäure nur bis zur Nucleotidstufe.

Hier sei nur ganz kurz vorausgeschickt, daß die nähere Untersuchung dieser „Nucleophosphatase" aus Leber (DEUTSCH **38)**) und aus Darmschleimhaut (LEVENE **39)**, KLEIN **40)**) ergeben hat, daß sie sich in keiner Weise von den anderen Ph. unterscheidet. Sie hat ein ph-Optimum von 9,0—9,2, spaltet Thymonucleinsäure ebenso leicht wie Glycerol-PhS, Hefennucleinsäure schwerer, Mg aktivirt. Dagegen behauptet TAKAHASHI **40a)**, daß Hefennucleins. nur dann kräftig angegriffen wird, wenn eine „Di-Esterase" mit einer Mono-Esterase kombinirt wirkt, und schließt indirekt daraus, daß in der Hefennucleins. alle 4 PhS-Gruppen auf beiden Seiten an Zucker gebunden sind, so daß eben nur die „Di-Esterase" diese Bindungen primär angreifen kann. Dies wäre also nach seiner Ansicht die „Polynucleotidase". In den Versuchen wurde alkalische Mono-Esterase (Schweinedarm) und die Habugift-Di-Esterase UZAWA's (l. c. 25) verwendet. CONTARDI c. s. (l. c. 28c) haben diese Angaben an sich bestätigt;

37a) ***Cl. Rimington, H. D. Kay,*** Phosphorous from caseinogen etc. ebd. **20**, 777 (1926). — 37b) ***W. Klein,*** Ferm. Depolymer. der tier. Nucl. Zs. phys. Chem. **218**, 164 (1933). S.A. — 38) ***W. Deutsch,*** Lebernucleotidase. Zs. phys. Chem. **171**, 264 (1927). — 39) ***P. A. Levene, R. T. Dillon,*** Intestinal Nucleotidase. Jl. of Biol. Chem. **88**, 753 (1931). — 40) ***W. Klein,*** Nucleophosphatase. Zs. phys. Chem. **207**, 125 (1932). S.A. — 40a) ***H. Takahashi,*** Ferm. Dephosphoryl. der Nucleinsäure. Jl. of Biochem. **16**, 463 (1932). S.A.

sie geben aber weiterhin an, dass diese Di-Esterase, welche die Nucleinsäure angreift, nichts mit der Cholin-Phosphatase zu tun habe (§ 285). Auf die Sache selbst kommen wir § 425 ff. zurück; nach W. KLEIN (l. c. 28b) fällt mit der Sonderexistenz einer Phospho-di-esterase auch die Formel von TAKAHASHI.

Muskeladenylsäure, Adenyl-pyrophosphorsäure sind hier zu behandeln, weil ein spezifisches Enzym in Frage steht, und weiterhin wohl die betr. Stoffe mit dem Abbau der eigentlichen Nucleoproteide des Zellkerns nichts zu tun haben. Es findet sich nämlich in allen tierischen Geweben neben der beim Abbau der „Hefennucleinsäure" entstehenden Adenylsäure = 1 Adenin-d-ribofuranosid-3-PhS (LEVENE **41)**) ein weiteres Nucleotid von sonst gleicher Struktur, aber in 5 phosphorylirt, das man bisher als „Muskeladenylsäure" bezeichnet hat.

Sie hat demnach die Formel: $C_4H_4N_3 — \overbrace{CH \cdot CHOH \cdot CHOH \cdot CH}^{O} \cdot CH_2 \cdot O \cdot PO_3H_2$ (LEVENE **41)**, KLIMEK und PARNAS **42)**). Die beiden Adenylsäuren verhalten sich auch fermenttypisch verschieden: die 3-PhS wird durch die unspezifische Phosphatase aller Organe ebenso zerlegt wie Glycerol-PhS etc. und von den Amidasen der Muskels nicht angegriffen, vielmehr erst auf der Nucleosidstufe zerlegt (LINDNER **43)**), während die 5-PhS durch Muskelenzym in Inosinsäure desaminirt wird. Da die unspecifische Ph. im Muskel praktisch fehlt, so wird also die 3-PhS kaum angegriffen; dagegen enthält der Herzmuskel (bei Nagern auch der Skelettmuskel) nach REIS **44)** ein spezifisches Enzym für die 5-PhS, das nur diese in Adenosin und PhS spaltet. Niere spaltet nach (l. c. 1) Ergadenylsäure, wenn auch langsamer als Monophenyl-PhS.

Die bisherigen Bezeichnungen Hefenadenylsäure für die 3-PhS und Muskeladenylsäure für die 5-PhS haben nun aber ihren Sinn verloren, da beide an beiden Orten und auch sonst vorkommen. Da die 3-PhS aus den Nucleinsäuren stammt, die andere nicht, so schlägt PARNAS vor, die 3-PhS als Adeninnucleotid zu benennen, und die andere einfach als Adenylsäure. Nach m. M. ist das nicht präcis genug, weil die einfache Bezeichnung „Adenylsäure" wieder zu Verwechselungen führen wurde, ich werde vorläufig den Vorschlag LINDNERS **43)** annehmen, sie **Syn-** und **Ergadenylsäure** zu nennen.

Dann haben wir folgende Synonyma:

Hefenadenyls. = Adenosin-3-PhS = Adeninnucleotid = Synadenylsäure.

Muskeladenyls. = Adenosin-5-PhS = Adenylsäure = Ergadenylsäure.

Während nun die Syn-Ad. kein weiteres Interesse hat insofern als sie auf dem normalen Wege über Zerlegung in Adenosin, Desaminirung und Dehydrirung in Harnsäure übergeht, ist die Erg-Ad. in verschiedenen Formen eine überaus interessante und wichtige Substanz, indem sie in weiterer Bindung sowohl in der Hefe wie auch im Muskel einen integrirenden Bestandteil des Aktivators des anoxybiontischen Zuckerumsatzes bildet, den man als Co-Zymase bezeichnet, und mit dem wir uns dort eingehend beschäftigen werden.

Inwieweit diese Ergadenylsäure ein normales Abbauprodukt der Nucleoproteide ist, oder neben diesen Stoffwechselabläufen synthetisch gebildet wird, ist an dieser Stelle ohne Belang. Wahrscheinlich hat dieses Nucleotid mit den echten Kern-Nucleoproteiden garnichts zu tun, es ist auch nicht im Kern, sondern im Plasma zu finden, wie eben seine große Bedeutung im Zellstoffwechsel zeigt. Auf die damit zusammen-

---

41) ***P. A. Levene, L. W. Bass,*** Nucleic acids. New York 1931, S. 195; s.a. ***P. A. Levene c.s.*** Jl. of Biol. Chem. **95**, 755, **98**, 9 (1932). — 42) ***R. Klimek, J. K. Parnas,*** Adenylsäure u. Adeninnucleotid. Bioch. Zs. **252**, 392 (1933). — 43) ***F. Lindner,*** Üb. Muskeladenyls. etc. Zs. phys. Chem. **218**, 12 (1933). — 44) ***J. Reis,*** Nucléotidase etc. Bull. Soc. Chim. Biol. **16**, 385 (1934); BPh **82**, 66.

hängenden Fragen ihrer Desaminirung und ihres weiteren Abbaus werden wir am geeigneten Orte zurückkommen, bei den Purinamidasen und -Dehydrasen. Hier interessirt sie nur deswegen, weil sie im Verlauf ihrer biologischen Funktion als Aktivator des Zuckerabbaus zu höheren Komplexen aufgebaut wird, die anscheinend durch eigene Enzyme wieder zu ihrem Ausgangsstoff Ergadenylsäure abgebaut werden.

Bei der Hefe ist dieser höhere Komplex noch nicht genau bekannt, nach MYRBÄCK **45)** besteht die Cozymase der Hefe — neben hier nebensächlichen accessorischen Faktoren — aus der Erg-Adenylsäure, an die noch eine N-haltige Gruppe, wahrscheinlich in Amidbindung angelagert ist. Sie wirkt in alkal. Lösung stark reducirend und hat anscheinend eine ganz andere Funktion als die des Muskels. Vielleicht ist sie wie Lactoflavin ein essentieller Teil des Gärungsenzyms selbst (MYRBÄCK). Die Cozymase der Hefe wird durch gewöhnliche (Nieren-)Phosphatase unwirksam, so daß also ein spezifisches Enzym wie bei der des Muskels (s. u.) nicht notwendig ist; Knochenph. spaltet sie viel langsamer (**46**).

Dagegen ist die Frage nach der chemischen Natur der Cozymase in tierischen Geweben, also in der Hauptsache im Muskel, durch LOHMANN **47), 48)** in den Hauptpunkten geklärt; dabei haben sich ganz neue Aspekte für die Theorie der Aktivatorenwirkung überhaupt und für den Ablauf der Anoxybiose im Muskel aufgetan, auf die wir hier nicht eingehen wollen, da uns hier nur die rein chemischen und enzymtypischen Fragen interessiren (vgl. LOHMANN **49)**). Die tierische Cozymase besteht — neben ionisirtem Magnesium, das ja bei vielen Phosphatasen eine deutliche Rolle spielt (§ 289a) —, aus Ergadenylsäure, an die noch zwei weitere Phosphorsäurereste als Pyrophosphat gebunden sind. LOHMANN bezeichnet diese Substanz als Adenyl-pyrophosphorsäure. (Näheres und Formeln § 294).

Dieselbe Substanz ist gleichzeitig auch von FISKE **50)** gefunden, aber nicht genauer untersucht worden. LOHMANN's Strukturdeutung ist von BARRENSCHEEN **51)** angefochten worden, der eine Bindung zweier unabhängiger PhS-Reste an die freie NH_2-Gruppe des Adenins annimmt, was LOHMANN **52)** widerlegt (s. a. § 294). Die enzymatische Bildung von Pyro-PhS bei der Spaltung ist von FERDMANN **52a)** angegeben worden. Damit im Zusammenhang steht die Benennung. Neben LOHMANN's Benennung ist auch die Bezeichnung Adenosintriphosphorsäure vorgeschlagen; wenn aber die Pyrophosphorsäure-Struktur nun endgiltig erwiesen ist, besteht kein Grund, neben der durch den Entdecker legitimirten Benennung noch überflüssigerweise eine zweite anzuwenden, noch dazu wenn diese erste Benennung im Hinblick auf die Struktur und enzymatische Spaltung rationeller und eindeutiger ist.

Die Substanz findet sich außer im Muskel nur noch in roten B.K.(BARRENSCHEEN **51)**). Im Muskel ist die gesamte Ergadenylsäure derart gebunden, freie findet sich im Muskelplasma nicht (von der Synadenylsäure der Zellkerne ist abgesehen) (LOHMANN **49)**); nach DOTZENRODT **53)** scheint aber noch eine Adenosin-di-PhS vorzukommen.

---

45) ***K. Myrbäck c.s.***, Cozymase I—VII. Zs. phys. Chem. **225**, 125, 131, 199 (1934) **238**, 87, 95, 148, 157 (1935); s. a. ***H. v. Euler c.s.***, Bestandt. der Dehydrasensysteme etc., ebd. **238**, 120. — 46) ***K. Myrbäck***, Cozymase und Phosphatase. Zs. phys. Chem. **217**, 249, **219**, 173 (1933). — 47) ***K. Lohmann***, Pyrophosphatfrakt. im Muskel. Naturw. **1929**, 624. — 48) ***K. Lohmann***, Chem. Natur der Cof. der Milchsäurebildg. Bioch. Zs. **237**, 445, **241**, 50, 67 — ***O. Meyerhof***, ***K. Lohmann***, ebd. **253**, 431 (1931/2). — 49) ***K. Lohmann***, Stoffwechsel des Muskels. Hb. der Bioch. Erg. Werk Bd. III, Jena 1935. — 50) ***C. H. Fiske***, ***Y. Subbarow***, Phosph. compounds of muscle and liver. Sci. **70**, 381 (1929). — 51) ***H. K. Barrenscheen***, ***W. Filz***, Chemie der Adenosin-triphosphors. Bioch. Zs. **250**, 281 (1932), **253**, 422. — 52) ***K. Lohmann***, ***Ph. Schuster***, Konst. der Adenylpyrophosphorsäure. Bioch. Zs. **254**, 381 (1932). S.A., **272**, 24 (1934). — 52a) ***D. Ferdmann***, ***O. Feinschmidt***, Dephosphor. der Adenosintriphosph. Bioch. Zs. **277**, 202 (1935). — 53) ***H. Dotzenrodt***, Ammoniakbild. Substanzen im Brustmuskel etc. Zs. phys. Chem. **226**, 58 (1934).

Die Wirkung dieses Aktivators beruht — zum Teil, er hat noch andere Wirkungen, die Sachlage ist noch nicht völlig klar — darauf, daß die lose angeheftete Pyrophosphorsäure abgespalten und dabei gleichzeitig in Phosphorsäure umgewandelt wird, und diese zur Phosphorylirung der Zucker bereit gestellt wird. Jedenfalls hat diese „Co-zymase" keinerlei Wirkungsgemeinschaft mit der der Hefe; sie ist völlig unwirksam bei der enzymatischen Dehydrirung von Alkohol und Hexose-mono-PhS (v. EULER **53a**)).

Die zur Synthese der Adenyl-pyro-PhS nötige PhS stammt aus der Kreatin-PhS. Der Zerfall von Kreatin-PhS geht nur über die Adenyl-pyro-PhS nach folgenden Gleichungen (LOHMANN **54**).

1) Adenyl-pyro-PhS ⟶ Adenylsäure + 2 PhS (oder auch ⟶ Adenosin-di-PhS + 1 PhS).

2) Adenylsäure + 2 Kreatin-PhS = Adenylpyro-PhS + 2 Kreatin.

Die Reaktion 2) ist umkehrbar (**48**): in der angegebenen Richtung verläuft sie am besten im frischen Muskelsaft bei neutraler Reaktion, während sie in umgekehrter Richtung bei alkal. Reaktion, am besten in gealterten Muskelsäften verläuft. Wahrscheinlich sind beide durch zwei verschiedene Enzyme katalysirt und erfolgen in verschiedenen Phasen der Muskelkontraktion: die Reaktion in der angegebenen Richtung verläuft im Beginn, die andere Richtung tritt später ein während der Milchsäurebildung (LOHMANN **49**), S. 373). In diesem Fall wird nach PARNAS c. s. **60**) und MEYERHOF **54a**) die PhS zur Synthese der Adenyl-pyro-PhS von phosphorylirten Zucker-abbaustoffen geliefert. PARNAS c. s. hatten angegeben, daß sich bei Gegenwart von Adenyl-pyro-PhS aus Phosphoglycerinsäure durch Umesterung der abgespaltenen PhS Kreatin-PhS bilden kann. MEYERHOF fand nun, daß sich nicht Phosphoglycerinsäure, sondern ihr Gleichgewichtsprodukt Phospho-brenztraubensäure (§ 286) zuerst mit Adenylsäure zu Adenyl-pyro-PhS verestert, und dann die Adenyl-pyro-PhS sich mit Kreatin zu Kreatin-PhS + Adenylsäure umlagert. Dies wäre also die erwähnte Umkehrung der oben genannten Reaktion 2).

Die Synthese ist eine stark endotherme Reaktion, sie kann also nur in gekoppelter Reaktion mit der Zerlegung von Kreatin-PhS erfolgen, wie dies auch in Muskelextrakten (ph = 7,0—7,3) beobachtet worden ist, ohne daß damals die Verhältnisse schon zu überblicken waren (LEHNARTZ **55**), FERDMANN **56**)), die erst durch LOHMANN geklärt wurden. Krebsmuskelextrakt kann Adenylsäure nicht phosphoryliren, wohl aber Adenosin-di-PhS (LOHMANN **56a**)). Auch die Synthese der Kreatin-PhS in der angegebenen Richtung ist endotherm (**54a**). Es läßt sich also die Rolle der Adenyl-pyro-PhS genauer definiren als die eines Aktivators des Enzyms, das die Kreatin-PhS spaltet. Auch die Abspaltung der Pyro-PhS findet in zellfreien Extrakten statt, so aus Muskel (LOHMANN), Leber (JACOBSEN **57**)).

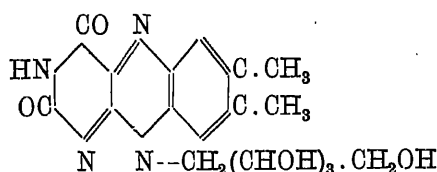
Es erfolgt dabei zwar gleichzeitig eine Desaminirung, indem nicht Adenylsäure, sondern Inosinsäure (Hypoxanthosin-5-PhS) auftritt; aber diese erfolgt nicht an der Adenyl-pyro-PhS selbst, sondern erst nach der Hydrolyse an der Ergadenylsäure (BARRENSCHEEN **58**), MOZOLOWSKI **59**), PARNAS **60**)). Nur mit HNO_2 ist die Inosin-pyro-PhS zu erhalten (LOHMANN).

Diese enzymatische Hydrolyse ist nach BARRENSCHEEN das Werk eines spezifischen Enzyms, der Adenylpyrophosphatase LOHMANN's, welche die beiden PhS in zwei Etappen abspaltet (§ 294). Dagegen ist die — langsame — Weiterzerlegung der Inosinsäure bedingt durch die überall verbreitete unspezifische Phosphatase. JACOB-

53a) ***H. v. Euler c.s.***, Char. dreier ... Co-enz. Ark. Kemi **11 B** Nr. 52 (1935). — 54) ***K. Lohmann***, Enzym. Aufspalt. der Kreatin-PhS etc. Bioch. Zs. **271**, 264 (1934). S.A. — 54a) ***O. Meyerhof, H. Lehmann***, Synthese der Kreatinphosph. durch Umesterung der Phosphobrenztraub. Naturwiss. **1935**, 337. — 55) ***E. Lehnartz***, Verknüpf. des Aufbaus und Abbaus (Muskel). Zs. phys. Chem. **184**, 1 (1929). — 56) ***D. Ferdmann***, Mech. der Umwandl. von P- Verbind. bei der Autol. des Muskels. Zs. phys. Chem. **187**, 160 (1930). — 56a) ***K. Lohmann***, Ang. Ch. **1935**, 165. — 57) ***E. Jacobsen***, Specif. Adenylpyrophosphatase. Bioch. Zs. **242**, 292 (1931), **257**, 221 (1933). — 58) ***H. K. Barrenscheen, S. Láng***, Adenosintriphosphatase. Bioch. Zs. **253**, 395 (1932). — 59) ***Wl. Mozolowski, J. Reis, B. Sobczuk***, Ammoniakbild. etc. im Muskel. Bioch. Zs. **249**, 157 (1932). — 60) ***J. K. Parnas, P. Ostern, T. Mann***, Verkett. der chem. Vorg. im Muskel. Bioch. Zs. **272**, 64, 275, 74 (1934).

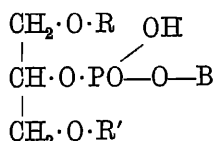
SEN 57) findet, daß auch das Adenylpyro-PhS spaltende Leberenzym streng spezifisch ist, es greift sonstige Pyrophosphate nicht an und ist auch mit der „Glycerophosphatase" nicht identisch. BARRENSCHEEN 58) bringt die von ihm bestätigte absolute Spezifität damit zusammen, daß es sich nach seiner Meinung hier eben garnicht um eine Pyro-PhS handelt (l. c. 51). Diese Spezifität wird von SATOH (l. c. 18a) bestritten, wir kommen darauf § 294 zurück.

Ein „Nucleotid" besonderer Art ist nach THEORELL 61) auch das **„gelbe Ferment"**, das zweite Atmungsferment WARBURG's, auf das hier nicht näher einzugehen ist. Es ist sichergestellt als eine Symplexbindung eines Protein-Trägers mit Lactoflavin, dem gelben Farbstoff des Vitamin B_2. Dieser Farbstoff ist gleichzeitig von P. KARRER und von R. KUHN **61a)** durch Abbau und Synthese sichergestellt als d-Ribose-Derivat des Trimethyl-iso-Alloxazins. Ohne den

```
      CO  N
HN/\/\/\C.CH3
OC| || |C.CH3
  \/\/\/
   N  N--CH2(CHOH)3.CH2OH
```

Träger wirkt es nur als Vitamin und als Wasserstoffüberträger. Das aktive, Sauerstoff übertragende, d. h. autoxydable Enzym enthält aber nach THEORELL noch Phosphorsäure an das Flavin gebunden, 1 PhS auf 1 Farbstoff, es ist eine ausgesprochene Säure. Es ist also eine Art Nucleotid, in dem an Stelle des Purinkernes der ähnliche Alloxazin-Kern gebunden ist. Das Ferment findet sich in allen Zellen.

Es wirkt aber auch das Flavin ohne Träger nur dann als Vitamin, wenn es nach der Aufnahme in den Tierkörper phosphorylirt wird. Dies gelingt auch in vitro ohne Weiteres durch Darmphosphatase bei ph = 7,2. Es geht dies aber nur mit dem echten Lactoflavin; schon das nahe verwandte Arabinose-Derivat wird schwer, die Flavine ohne Zuckerseitenkette garnicht enzymatisch phosphorylirt (KUHN und RUDY **61b**)).

§ 285. 3) **Phosphorsäure-Ester der Phosphatidbasen**, also Cholin in den Lecithinen, Colamin (Amino-äthylalkohol) in den Kephalinen. Die allgemeine Struktur der Phosphatide ist die einer Glycerol-PhS, an die beiden freien Hydroxyle Fettsäurereste gebunden, an ein freies OH der PhS je nachdem Cholin $^{+}(CH_3)_3N \cdot CH_2 \cdot CH_2OH$ oder Colamin $^{+}H_3N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH$. Nehmen wir die — im Eilecithin ganz überwiegende — β-Glycerol-PhS als Grundlage, so erhalten wir die Grundformel (R, R' Fettsäurereste, einer gesättigt, einer ungesättigt):

```
CH2·O·R   OH
|        /
CH·O·PO—O—B
|
CH2·O·R'
```

Aus diesem Komplex spalten nun die eigentlichen Lecithasen A und B die Fettsäuren ab (§ 280), und es verbleiben die Glycerophosphate der Base. Hier setzen nun Phosphatasen ein: die eine löst der Bindung zwischen Glycerol und PhS, dies dürfte die ganz allgemein wirksame Phosphatase schlechthin sein. Es hängt diese Frage mit

61) ***H. Theorell,*** Wirkungsgruppe des gelben Ferm. Bioch. Zs. **275,** 37 (1935). — 61a) ***W. Rudy,*** Vitamin B_2, Hb. der Bioch. Erg. Werk. Bd. III, Jena 1935. — 61b) ***R. Kuhn, W. Rudy,*** Enzym. Phosphoryl. von Lactoflavin. Konstit. der Flavine. Naturwiss. **1935,** 286.

der allgemeineren zusammen, ob es für die an 2 OH gebundene PhS eine besondere Phosphodi-esterase gibt, wie dies von der Schule AKAMATSU angenommen wird. Tatsächlich wird von diesen japanischen Forschern behauptet, daß es für die Zerlegung des Komplexes Glycerol-PhS-Cholin zwei verschiedene Phosphodiesterasen gibt, eine in den Schlangengiften, eine zunächst in der Taka gefunden, von denen je eine die Bindung entweder zwischen Glycerol und PhS oder zwischen Cholin und PhS löst. Wir haben dies schon § 283 kurz erwähnt und kommen unten darauf zurück.

Abgesehen von dieser Spezialfrage entsteht nun aber für die Glycero-phosphatase an sich die weitere Frage, ob es deren nicht zwei gibt: eine für α, eine für β. Gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymen sind zweifellos vorhanden, aber für die Annahme ganz verschiedener Enzyme reichen sie nicht aus.

Die Frage hat insofern eine biologische Wichtigkeit gewonnen, als sich die frühere Annahme, daß in allen Phosphatiden die β-Glycerol-PhS weit überwiegt, als irrtümlich herausgestellt hat. Sie gilt zwar für das meist untersuchte Eierlecithin, das 80—85 % β enthält (**62**); aber nicht allgemein. Mit Hilfe einer besonderen analytischen Methodik, die grade auf der verschieden schnellen Spaltung der beiden optischen Formen der Glycerol-PhS durch verschiedene Enzyme beruht, fanden RAE, KAY und KING **63**) ganz verschiedene Verteilungen. Im Eilecithin überwiegt bei weitem β; im Gehirnlecithin α, und in der Leber finden sich beide zu gleichen Teilen. Eine noch präcisere Bestimmung der α-Glycerol-PhS in Gemischen ermöglicht der Befund von SCHÄFFNER c. s. (l. c. 71), daß ihre Hefenph. ausschließlich α-Glycerol-PhS zerlegt, auf dem sie eine analytische Methode aufgebaut haben (**63a**).

Diese Frage, ob sich α- und β-Glycerol-PhS gegen die enzymatische Zerlegung verschieden verhalten, hängt mit der mehr prinzipiellen Frage zusammen, ob sich überhaupt sekundäre Ester (hier also β) anders verhalten als primäre, wofür auch bei synthetischen Estern einiges Material vorliegt (§ 287). Es sind manchmal garkeine, manchmal geringe Verschiebungen in der Geschwindigkeit, im opt. ph etc. angegeben worden; die totale Zerlegung gelingt schließlich bei beiden mit allen Enzymen: es liegt danach noch kein Grund vor, zwei ganz verschiedene Glycerophosphatasen anzunehmen; im Gegenteil ist heute die von KAY, HOMMERBERG u. a. begründete These, daß die „Glycerophosphatase" nichts anderes ist als die allgemeine unspezifische Ph., die auch Zuckerphosphate und Nucleotide angreift, allgemein angenommen. Indessen machen die Befunde SCHÄFFNERS (l. c. 71) an Hefe die Entscheidung wieder zweifelhaft.

Die völlige Zerlegung beider Glycerol-PhS ist für Wirbellose (*Helix*) von KARRER **64**), für Warmblüter (ph = 9) von KAY (l. c. 15, 16), für pflanzliche (*Sinapis alba*) von FLEURY **65**) gezeigt worden, nachdem sie z. B. für Taka schon lange bekannt war.

Bei diesem Enzym von *Sinapis* waren zwischen α und β auch in der Geschwindigkeit der Hydrolyse keine Unterschiede festzustellen. Dasselbe gilt für schwarzen Senf und Mandeln; stets ist das Verhältnis der Hydrolysen-Anfangsgeschwindigkeiten fast genau = 1,0 (β/α = 1,0—1,15). Auch der opt. ph ist für α und β der gleiche (*Sinapis alba*), verschiebt sich gleichmässig mit steigender Substratkonz. nach alkalisch (vgl. § 289) (COURTOIS **65a**)). Dagegen liegen für eigentlich alle anderen Enzymtypen Angaben über Differenzen vor; indessen sind die Verhältnisse merkwürdig verworren, es scheinen sich die Enzyme höherer Tiere grundsätzlich anders zu verhalten, als die niederer Tiere und der Mikroben, und auch diese wieder verschieden.

---

62) ***P. Karrer, H. Salomon,*** Glycerin-PhS aus Lecithin. Helv. Ch. A. **9**, 3 (1926). S.A. — 63) ***J. J. Rae, H. D. Kay, E. J. King,*** Recognit. and separ. of α-and β-glycerophosphates. Biochem. Jl. **28**, 143, 152 (1934). S.A. — 63a) ***A. Schäffner, E. Bauer,*** Enzymat. Best. Meth. von Glyceroph.-S. Zs. phys. Chem. **232**, 64 (1935). — 64) ***P. Karrer, R. Freuler,*** Enzym. Spaltg. der Glycerinphosphors. Festschr. f. A. TSCHIRCH, 1926, 421. — 65) ***P. Fleury, Z. Sutu,*** Hydrolyses compar. des ac. glycérophosph. etc. Bull. Soc. Chim. [4] **39**, 1716 (1926). — 65a) ***J. Courtois,*** Hydrol. des acides . . . glycérophosph. par phosphatases de graines. C. R. **199**, 1252 (1934).

Dazu sind noch einige Angaben direkt kontrovers. Bei höheren Tieren wird fast einstimmig angegeben, daß die beiden nunmehr endgiltig festgelegten Ph. sich verschieden verhalten. Nach KAY 66) und ROCHE 67) bevorzugen in allen Organen die „alkalischen" Ph. (opt. ph = 9) die β-Form. Wenigstens gilt dies, wenn man nahe am opt. ph arbeitet, bei Verschiebung nach ph = 7,6 zerlegt nach KAY 66) Plasmaph. $\alpha > \beta$. Eine entgegengesetzte Angabe finde ich bei DI RIENZO 68), nach der Knochenph. die α-Form bevorzugt; jedoch ist hier eine Unklarheit insofern, als seine Tabelle das Gegenteil besagt und man mithin nicht weiß, ob ein Schreibfehler in der Tabelle oder in der Schlußfolgerung seine Angaben verzerrt.

Dagegen spalten die „sauren" Ph. der Gewebe (ph = ca. 6), die nach WALDSCHMIDT-LEITZ nur aus den Erythrocyten stammen und mit diesen in die Gewebe getragen werden (l. c. 14), ausgesprochen α besser (67). Nur die Ph. der Milz mit einem ph-Opt. von 4,8 soll auf β dreimal schneller als auf α wirken (DAVIES 68a)), während bei 9,0 kein Unterschied zu finden ist.

Abb. 7.
Rates of hydrolysis by taka-phosphatase of pure Na α-glycerophosphate and β-glycerophosphate and mixtures of the two salts in varying proportions, at pH near the optimum (nach KAY und LEE 66)).

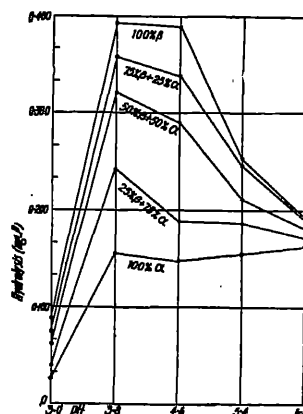
Enzym aus Reiskleie spaltet die α-Form besser (CONTARDI 69)); das aus Sojabohnen bevorzugt β (66); Helixenzym bei ph = 3 etwas β (64).

Widersprechend lauten die Angaben für Taka. Nach CONTARDI 69) soll das Enzym α besser spalten; KAY und LEE 66) zeigten aber, daß in der Nähe des opt. ph = 4—5 β wesentlich schneller zerlegt wird.

Demgegenüber gibt die Schule AKAMATSU an, daß sich Taka je nach dem ph ganz verschieden verhält, was eben auch für andere primäre resp. secundäre Ester gelten soll (§ 287). So gibt ASAKAWA 70) an, daß Taka zwar bei ph = 8 viel schneller auf β als auf α wirkt, daß aber bei ph = 5,4 dieser Unterschied völlig geschwunden ist, und daß eben dies ein ganz allgemeiner Unterschied für verschieden gebundene Ester sein soll. Auf die Wirkungsverschiebungen beim Wechsel des ph, die wohl eher mit dem Substrat als mit dem Enzym zu tun haben, kommen wir § 289 zurück.

Ein extremer Fall liegt nach SCHÄFFNER 71) bei der einen Ph. der Hefe vor. Bei ihrem opt. ph (ca. 6) spaltet sie praktisch ausschließlich α, greift auch Di-Ester der Ph. kaum an, und Zucker-PhS nur träge. Hier scheint demnach eine spezifische Mono-Esterase für primäre Alkohole vorzuliegen, deren Prüfung an synthetischen Estern besonders interessant wäre. Daneben gibt es aber nach ALBERS (l. c. 11a) auch hier eine zweite Ph. mit stark saurem Optimum (4,0), die grade Zymophosphat sehr schnell zerlegt, und $\beta > \alpha$.

Für die Synthese durch Takaph. gibt SUZUKI 72) an, daß (bei ph = 8,4) α und β in fast gleicher Menge entstehen; bei ph = 5,4 soll keine Synthese stattfinden, was nach den Angaben für den opt. ph der Takaph. (§ 289) sehr wenig wahrscheinlich ist.

Besondere Enzyme werden aber für α- resp. β-Ester von keinem der Untersucher (außer für Hefe) angenommen. Nach den bisher vorliegenden Daten scheint es so, als

66) ***H. D. Kay, E. R. Lee,*** Rate of hydrol. of α- and β-glyc. phosph. Jl. of Biol. Chem. **91,** 135 (1931). S.A. — 67) ***J. Roche,*** Blood-phosphatase. Biochem. Jl. **25,** 1724 (1931). S.A. — 68) ***A. di Rienzo,*** Az. d. fosfat. d. osse sull ac. glicerof. Boll. Soc. Ital. Biol. **5,** 1034 (1930). S.A. — 68a) ***D. R. Davies,*** Phosph. activ. of spleen etc. Biochem. Jl. **28,** 529 (1934). — 69) ***A. Contardi, A. Ercoli,*** Enzym. Spalt. des Lecith. Bioch. Zs. **261,** 269 (1933). S.A. — 70) ***K. Asakawa,*** Spalt. der versch. Phosphors.-Ester. Jl. of Biochem. **11,** 143 (1930). — 71) ***A. Schäffner, E. Bauer,*** Hefenphosphatase. Zs. phys. Chem. **232,** 66 (1935). — 72) ***B. Suzuki, T. Maruyama,*** Glyc.-Ph.-acid synth. by glycerophosphatase. Proc. Imp. Acad. Tokyo **6,** 67 (1930).

ob alle die verschiedenen Typen der Phospho-Esterasen (vgl. § 283) beim optimalen ph die β-Form etwas besser spalten, bei einer Verschiebung davon weg nach sauer oder alkalisch die α-Form; nur die „saure" Ph. (Hefe, Blutkörper) scheint sich umgekehrt zu verhalten, bei ihrem opt. ph von ca. 6 spaltet sie $\alpha > \beta$. Das läßt daran denken, daß hier nur die Dissociationsverhältnisse der beiden Substrate entscheiden, daß bei stark saurem ph (= 3) oder alkalischem (= 9) die β-Form an sich leichter zerfällt, bei mittlerem ph (5—6) die α.

Nehmen wir also die „Glycerophosphatase" vorläufig als einheitlich an, so entsteht nun die zweite Frage, ob es eine besondere Cholinphosphatase gibt, welche die Bindung zwischen Cholin und PhS löst, also in dem Substrat $^{+}(CH_3)_3N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot O \cdot PO(OH)_2$. Diese Frage ist erst ganz neuerdings zur Diskussion gestellt worden, als man den Abbau der Lecithine systematischer untersucht hat.

So tritt CONTARDI (l. c. 69) für die Existenz einer besonderen Cholin-phosphatase ein, weil er Wirkungsverschiebungen zwischen verschiedenen Präparaten in bezug auf die totale Freisetzung der PhS sah. Wenn er — Lysolecithin als Substrat — einerseits die Abspaltung der Fettsäuren durch Lecithase B, gekennzeichnet durch Aufhebung der Hämolyse, andererseits die freigesetzte PhS verglich, so sah er bei Reiskleie eine gegenüber Taka verlangsamte Freisetzung der PhS, und davon abgesehen war bei 30tägiger Dauer bei Reiskleie die PhS erst zu 18 %, bei Taka dagegen zu 77 % frei. Er schließt daraus, daß 1) die Hydrolyse des Komplexes Glycero-PhS-Cholin in zwei Stufen erfolgt, indem zuerst das Cholin abgelöst werden muß, ehe die eigentliche Glycerophosphatase wirken kann, und 2) daß dazu eine specifische Cholinphosphatase nötig ist, die in Pflanzensamen generell fehlt, so daß bei Enzymkomplexen aus solchem Material die Phosphatidspaltung unvollkommen bleibt; 3) soll die gewöhnliche Glycerophosphatase demgemäß auf Glycero-PhS-Cholin ohne Einfluß sein. Diese letzte entscheidende Behauptung ist freilich an reinem Substrat noch nicht experimentell erwiesen.

Die Angabe CONTARDI's, daß erst der Glycerol-PhS-Cholin-Komplex zerlegt werden muß, ehe die Glycerophosphatase angreift, scheint aber auch nicht generell zuzutreffen. Es scheint vielmehr u. U. auch Cholinphosphat durch Wirkung der Glycerophosphatase primär freigesetzt zu werden. Die Verhältnisse sind noch sehr unklar und bedürften einer gründlichen präparativen Durchforschung. So finde ich z. B. noch keine Darstellung der Glycero-PhS-Cholinverbindung in reinem Zustande, weder durch Abbau noch synthetisch, an der die Wirkung einer isolirten Cholin-phosphatase geprüft werden könnte. Was vorliegt, sind immer nur Messungen von allerlei Verschiebungen zwischen Lecithin, Cholin und PhS. Dabei kann eine klare Entscheidung nicht erwachsen.

So kommt z. B. KING **73)**, **74)** aus seinen Zahlen bei der Lecithinspaltung durch Organe zu dem Schluß, daß nach Abspaltung der Fettsäuren sich als weitere Phase entweder Glycerophosphat oder Cholinphosphat bilden kann, ohne daß man klar sagen kann, unter welchen Bedingungen das Eine oder Andere erfolgt. KING unterscheidet zwar zwischen Lecithase und Phosphatase (§ 280), aber er versteht unter „Phosphatase" nur die, welche freie Glycerol-PhS angreift, während er auch seine „Lecithase" an der Freisetzung von PhS mißt; dies führt natürlich zu den mehrfach angedeuteten Konfusionen, da es sich dann notwendigerweise um kombinirte Wirkungen verschiedener und ungleich verteilter Enzyme handeln muß. So ist es kein Wunder, wenn KING für seine „Lecithase" eine andere Verteilung findet, als für die (Zucker-)Phosphatase: (absteigend) Niere, Darm, Milz, Leber, Hoden, Pankreas, Dickdarm, Gehirn, Ovar, Knochen, Nebenniere, Lunge, Blutgefäße, Muskel. Kephalin, synthetisches Distearyl-lecithin und Distearylphosphat werden langsamer angegriffen als natürliches Lecithin, am besten Bromlecithin. Auch der von ihm gefundene opt. ph = 7,5 ist der der Fettsäureabspaltung, nicht der PhS-Freisetzung.

Dieses Problem, das bei der verwickelten Sachlage von der Untersuchung der

73) ***H. King, E. J. King, J. H. Page,*** Enz. Spalt. von Lecithin. Zs. phys. Chem. **191**, 243 (1930). — 74) ***E. J. King (M. Dolan),*** Enz. hydrol. of (lecithin) phosphatides. Biochem. Jl. **25**, 799 (1931), **27**, 403 (1933), **28**, 476 (1934).

Lecithinspaltung aus nicht zu lösen war, ist nun von Seiten AKAMATSU's und seiner Schüler in ein ganz anderes Licht gerückt worden. Wir haben auf diesen Zusammenhang mit der dort vorgeschlagenen Unterteilung der Phospho-esterasen bereits § 283 hingewiesen, und können uns somit hier kurz fassen. Der Vergleichspunkt wird darin gesucht, daß der Glycerol-PhS-Cholin-Komplex enzymtypisch zu den sog. Di-Estern gehören soll, bei denen also zwei Alkylreste an 2 OH der PhS gebunden sind. Für diese Ester nimmt AKAMATSU eine besondere Gruppe von Enzymen in Anspruch, die Phosphodi-esterasen, die z. B. auf Diphenyl-PhS wirken. In fast allen biologischen Objekten sind diese Enzyme gemengt mit den „Mono-Esterasen". Nur im Schlangengift fand UZAWA (l. c. 25) die „Di-Esterase" wirkungsrein. Und dieses Enzym soll identisch sein mit der Cholin-Phosphatase. Es löst nur das Cholin vom Komplex ab, genau wie es aus der Diphenyl-PhS nur ein Phenol ablöst, ohne daß freie PhS entsteht, was also die Verschiebungen in der Abspaltung freier PhS, wie sie CONTARDI und KING beobachtet haben, als Ergebnis zweier verschiedener Fermentwirkungen erklären würde.

Leider muß AKAMATSU selbst (Priv. Mitt.) diese an sich schöne und einfache Erklärung wieder kompliciren. Denn eine andere Di-Esterase, die sein Schüler UDAGAWA (l. c. 27) aus Taka isoliren konnte, soll nun grade umgekehrt als specifische Di-Esterase den Glycerol-PhS-Cholin-Komplex nur zwischen Glycerol und PhS spalten, also Cholinphosphat freisetzen. Da Näheres noch nicht veröffentlicht, kann man darüber kein Urteil abgeben, aber wahrscheinlich ist diese erneute Komplikation zweier streng specifischer Di-Esterasen nicht; überhaupt scheint mir die Existenz einer solchen Sondergruppe noch durchaus nicht erwiesen angesichts der überaus verwickelten Erklärungsversuche von HOTTA (l. c. 28), nach denen Di-Ester je nach ihrer Struktur bald nur von den specifischen Di-Esterasen, bald von den nicht specifischen Mono-Esterasen gespalten werden sollen. Diese Dinge bedürfen dringend einer Nachprüfung. Dass CONTARDI (l. c. 28c) die Identität der UZAWA'schen Di-Esterase mit der Cholin-Phosphatase ablehnt, und daß sie nach KLEIN (l. c. 28b) überhaupt nicht existirt, ist §§ 283, 284 bereits erwähnt.

Die Frage, ob einerseits eine besondere Cholinphosphatase existirt, andererseits die Glycerophosphatase mit den Zuckerphosphatasen identisch ist, wird auch durch Beobachtungen nicht geklärt, die darauf hinweisen, daß die ausgesprochenen Zuckerphosphatasen, d. h. in dieser Hinsicht besonders wirksame Organextrakte, auf Gesamtlecithin u. U. nicht einwirken. Das kann natürlich daran liegen, daß die Besetzung der freien OH-Gruppen durch die massiven Fettsäurereste die Affinitäten tiefgreifend beeinflußt, so daß also die Phosphatase, ganz gleich was für eine, erst nach Entfernung dieser Gruppen durch die Lecithasen angreifen kann. Wenn diese also fehlen, bleibt jede Wirkung aus.

So geben KING und PAGE (l. c. 73, 74) an, daß Knochenextrakte mit ihrem auf Zucker-Monophosphate stark wirksamen Enzym Lecithin nicht angreifen, wohl aber Niere und Darm. Es ist nun interessant, daß Knochenextrakte auf Lysocithin wirksam werden (KING), wenn sie also nur noch eine Fettsäure vorfinden. Entweder enthält der Knochen also Lecithase B ohne A, oder die Phosphatase kann am Lysolecithin schon ansetzen, etwa Cholin abspalten. Alle diese Dinge sind auch rein präparativ-chemisch noch unerforscht.

Eine direkte Vergleichung von reinen Glycerophosphaten und reinen Zuckerphosphaten mit Enzymen aus Knochen und Niere ergab in bezug auf die Kinetik genau dieselben Verhältnisse. Damit ist die Identität der Glycero- und der Zuckerphosphatasen überaus wahrscheinlich geworden (HOMMERBERG 75)), die zuerst von KAY (l. c. 16) auf Grund der gleichmäßigen Verteilung der beiden Wirkungen in allen tierischen Geweben angenommen wurde.

75) ***Cl. Hommerberg***, Spec. tier. Phosphatasen. Zs. phys. Chem. **185**, 123 (1929).

§ 286. 4) **Die Kohlenhydrat-Phosphorsäureester (76, 77).** Die große Mannigfaltigkeit der hier als enzymatische Substrate bekannt gewordenen Ester können wir einerseits einteilen in solche, die bei biologischen Prozessen spontan entstehen, und solche, die ganz synthetisch gewonnen werden, oder teilweise, durch Umwandlung aus biologischen Estern. Da wir aber einerseits als z. Z. allgemeine Meinung annehmen dürfen, daß alle diese Ester durch ein einziges Enzym gespalten werden, das wir zur Bequemlichkeit ohne Rücksicht darauf, daß sie mit den anderen Phosphatasen sehr wahrscheinlich identisch ist, als **Zuckerphosphatase** bezeichnen wollen; da wir hier andererseits von der biologischen Bedeutung aller dieser Stoffe im Zuckerabbau ganz absehen wollen, und zudem noch nicht einmal wissen, ob auch nur ein einziger dieser präparativ erhaltenen Ester ein wahrhaftes Zwischenprodukt ist (vgl. z. B. LOHMANN **78**)), so empfiehlt sich eine rein systematische Einteilung nach ihrer chemischen Natur. Dann kommen wir zu folgendem Schema:

1) Hexose-Phosphate.
2) Biose-Phosphate.
3) Amylose-Phosphate.
4) Phosphate der im Abbau entstehenden C_3-Körper (Phosphoglycerinsäuren, Phosphobrenztraubensäure, Triosephosphate).

Davon wollen wir die **Amylose-PhS** kurz vorwegnehmen. Sie wird rein chemisch in ihren Beziehungen zu den Sondereigenschaften des Glykogens und Amylopectins im Verhältnis zur P-freien Amylose § 372 berücksichtigt werden, da diese Frage von der des Stärkeaufbaues nicht zu trennen ist. Ob das Enzym, das Amylose-PhS angreift, die normale Zuckerphosphatase ist, ist auch heute noch nicht entschieden (H. W. § 293). Nach HEIDUSCHKA **78a**) werden von einem durch Tonerde-Adsorption gereinigten Enzympräparat aus Malz in 48 h. 90 % der PhS in anorganische Form übergeführt. In kurzeren Zeiten entstehen sehr wechselnde Mengen organischen löslichen Phosphors, vielleicht gibt es doch mehrere in Stufen wirkende Phosphatasen im Malz. Nach SAMEC **79**) spalten alle tierischen und pflanzlichen Phosphatasen aus natürlichen (Amylopektin) und synthetischen Stärke-phosphaten die PhS ab; am stärksten wirkt bei Amylopectin Hefe; Muskel löst zwar die PhS aus dem kolloiden Aggregat ab, aber sie verbleibt in organischer Bindung (es fehlt also auch hier die Phosphatase im Muskel); Soja wirkt nur auf synthetische Amylo-PhS. Es liegt also auch hier wahrscheinlich die allgemeine unspecifische Ph. vor. POSTERNAK **79a**) hat den PhS-Polysaccharid-komplex bei der Diastasespaltung isolirt, er ist wechselnd groß (kleinster C_{56}), aber immer 1 P auf eine reducirende Gruppe. Bei der Säurespaltung entsteht daraus erst Maltose-PhS, dann der ROBISON-Ester, Glucose-6-PhS.

Ebenso ist über die **Phosphate der Biosen und der Triosen** nicht viel zu sagen. Erstere sind entweder rein synthetisch hergestellt, wie die Saccharose-PhS, oder sie entstehen als Nebenprodukte in geringen Mengen beim biologischen Zuckerabbau, wie Trehalose-PhS; oder schließlich beim Angären von Biosen, so ein Maltosephosphat.

Die phosphorylirten C_3-Körper spielen eine sehr gewichtige Rolle im Zuckerabbau **80**); aber sie sind alle erst in jüngster Zeit als solche erkannt und rein dargestellt. Ihre rein hydrolytische Zerlegung mit Abspaltung von PhS wird verdunkelt

76) ***K. Lohmann,*** Zuckerphosphorsäureester. Hb. der Bioch. Erg. Bd. S. 132, Jena 1930. — 77) ***H. Ohle,*** Zucker u. Derivate. Hb. der Bioch. Erg. Werk. Bd. I, S. 106. Jena 1933. — 78) ***K. Lohmann,*** Bild. u. Aufspalt. von Phosphors.-Estern etc. Bioch. Zs. **222**, 324 (1930). — 78a) ***A. Heiduschka, W. Karsch,*** Amylophosphatasen. Zs. ges. Brauw. **51**, 145 (1928). — 79) ***M. Samec,*** Hydrol. enzym. des amylophosphates etc. C. R. **181**, 532 (1925); Stärkedextrine. Bioch. Zs. **187**, 120 (1927). — 79a) ***Th. Posternak,*** Phosphore de la fécule etc. C. R. **197**, 1157, **198**, 506 (1933/4). — 80) ***K. Lohmann,*** Zuckerabbau in der tier. Zelle. Hb. der Bioch. Erg. Werk. Bd. I, S. 922. Jena 1933.

durch weitgehende Oxydo-Reduktionen, so daß sie biologisch garnicht herauszuschälen ist; ihre Zerlegung in diesem Sinne durch zellfreie Enzyme ist noch wenig untersucht. Wir können uns mit kurzen Andeutungen begnügen, von wem und wie diese Stoffe hergestellt sind, damit wir die Stoffe an sich und ihre rein hydrolytische Zerlegung kennen, und darauf beim Zuckerabbau nicht mehr zurückzukommen brauchen.

Biosephosphate: Saccharosephosphat, synthetisch von NEUBERG erhalten, wird durch Hefe selbst und Preßsäfte zerlegt (*l. c. 451, 452*). NEUBERG **81**) erhielt mit Nierenenzym reinen Rohrzucker. Das entspr. Enzym findet sich überall, aber in verschiedener Verteilung. Diese soll von der der Glycerol-PhS und Hexose-PhS spaltenden Enzyme verschieden sein, z. B. das Enzym beim Menschen nur in Pankreas, Nebenniere und Tumoren vorkommen (FORRAI **82**)); jedoch ist diese Angabe nach den Befunden allgemeinen Vorkommens (TOMITA **83**)) recht unwahrscheinlich. Es handelt sich sicherlich um die ganz unspezifische Phosphatase. Bemerkenswert die sehr schwache Muskelwirkung, die bei allen Phosphatasen gefunden ist. Nach OHMIYA **84**) wird Saccharose-PhS von sämtlichen Typen der Phosphatase leicht gespalten.

Trehalose-PhS entsteht als Nebenprodukt bei der Gärung von Trockenhefe und Zymin (ROBISON und MORGAN **85**)), wahrscheinlich durch Stabilisirung eines aktiven, aber unbeständigen Hexosephosphates. Trehalose ist ein α-Glucosido-glucosid, d. h. eine Biose, deren beide Glucose-Reste in 1 gebunden sind, die also nicht reducirt (vgl. § 330).

Der Ester dreht sehr stark rechts, freie Säure $[\alpha]_D = 185°$. Da er neben dem ROBISON-Ester entsteht, und die Säurehydrolyse eine damit anscheinend identische Glucose-PhS liefert, wird man annehmen dürfen, daß die eine PhS-Gruppe in 6 steht. Knochenphosphatase spaltet die PhS leicht ab, ohne das Dissacharid zu verändern.

Die Trehalose-PhS bildet sich besonders bei geringer Phosphatkonz., bei langer Gärzeit verschwindet sie zu Gunsten von Zymophosphat (ROBISON), bei frischer Hefe verhält es sich nach VEIBEL **86**) anders, hier nimmt sie bei langer Dauer zu (Bierhefe). Reichlich bildet sich Trehalose-PhS aus Maltose mit frischer oder Trockenhefe, nicht mit Macerationssaft (BABA **87**)).

Dasselbe oder noch ein weiteres Biosephosphat erhielt NEUBERG **88**) durch Einwirkung eines Trockenpräparates von *B. Delbrücki* auf Zymophosphat. Der Befund konnte nicht reproducirt werden **89**). Nach HVISTENDAHL **90**) soll es sich um Maltose-monophosphat handeln; er hält das Zymophosphat für ein Maltose-tetraphosphat. Maltose-PhS aus Stärke s. o. (POSTERNAK **79a**)). Über künstlich hergestellte weitere Phosphate (Maltose, Methylglucosid) und ihre Zerlegung einerseits durch Phosphatase, andererseits Hexosidasen s. OHMIYA **84**). Phosphatasefreie Saccharase spaltet Saccharosephosphat ohne Dephosphorylirung (s. o.), dagegen wurde α-Methylglucosid-PhS von Hefe nicht mehr angegriffen. Wir kommen darauf bei den Oligasen zurück.

Triose-Phosphate u. ä. Glycerinaldehyd-PhS, $H_2O_3 \cdot P \cdot O \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot CHO$ (H. O. FISCHER **91**)) hat eine große Bedeutung im Zuckerabbau, ist aber anscheinend nicht das eigentliche Zwischenprodukt, obgleich ihre d-Komponente vergärbar ist (SMYTHE **92**)), im Gegensatz zum freien Glycerinaldehyd.

---

81) ***C. Neuberg, M. Behrens,*** Enzym. Abspalt. v. Rohrzucker etc. Bioch. Zs. **170**, 254 (1926). — 82) ***E. Forrai,*** Saccharophosph. in menschl. Organen. Bioch. Zs. **144**, 149, **145**, 54 (1924). — 83) ***M. Tomita,*** Saccharophosphatase. Bioch. Zs. **131**, 161 (1922). — 84) ***S. Ohmiya,*** Ferm. Hydrol. d. Hexosidphosphors. Jl. of Biochem. **18**, 125 (1933) S. A. —85) ***R. Robison, W. Th. J. Morgan,*** Trehalose-monophosphors.-ester etc. Biochem. Jl. **22**, 1277 (1928); **24**, 119 (1930). S.A. — 86) ***Stig Veibel.*** Vorgänge bei der Phosphorylirung. Bioch. Zs. **239**, 350 (1931). — 87) ***T. Baba,*** Phosphoryl. von Maltose etc. Bioch. Zs. **278**, 207 (1934). — 88) ***C. Neuberg, J. Leibowitz,*** Bioch. Darst. e. Disach.-monophosphors.-Esters. Bioch. Zs. **193**, 237 (1928). — 89) ***A. Tychowski, M. Kobel,*** Umwandl. von Hexose-di-phosph. etc. ebd. **209**, 134 (1929). — 90) ***Br. Hvistendahl,*** Zymophosphat u. alkohol. Gärung. Ang. Chemie **1933**, 355. — 91) ***H. O. L. Fischer, E. Baer,*** 3-Glycerinaldehyd-phosphors. Ber. Chem. Ges. **65**, 337, 1040 (1932). — 92) ***C. V. Smythe, W. Gerischer,*** Vergärung von ... Glycerinaldehyd-PhS. Bioch. Zs. **260**, 414 (1933).

Dioxy-aceton-PhS, $H_2O_3 \cdot P \cdot O \cdot CH_2 \cdot CO \cdot CH_2OH$, ist von MEYERHOF und LOHMANN **93)** als sehr wichtiges Zwischenprodukt des Zuckerabbaus erhalten worden. Sie entsteht ganz direkt aus dem Hexose-di-phosphat (s. u.) durch hälftige Zerlegung in völlig reversibler Reaktion durch ein besonderes Enzym Zymohexase, das erste im desmolytischen Kettenabbau gewonnene Enzym mit völlig klarer Wirkung, wenn man von der Carboxylase absieht. Synthese von KIESSLING **93a)**. Derselbe Abbau von Zymophosphat zu einer Triose-PhS läßt sich nach NEUBERG c. s. **93b, c)** auch mit Hefen, Bakterien, Schimmelpilzen, Pflanzensäuren und Tabakblättern bewirken. Glycerinsäure-Monophosphorsäure, **Phosphoglycerinsäure,** $H_2O_3 \cdot P \cdot O \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot COOH$ ist seit kurzem durch neue Befunde von NILSSON und EMBDEN in den Brennpunkt des Interesses gerückt, weil sie als eine der wichtigsten Schlüsselsubstanzen des anoxybiontischen Zuckerabbaus erkannt worden ist. Sie zeigt aber auch in ihrer rein enzymchemischen Reaktionsfähigkeit, ihrem Verhalten gegen „Phosphatasen" Besonderheiten, so daß wir sie hier ausführlicher besprechen müssen, unbeschadet der eingehenden Würdigung ihrer Rolle beim Zuckerabbau, auf die wir erst am geeigneten Ort eingehen werden. Hier sei nur soviel gesagt, daß sie biologisch aus Dioxyaceton-PhS (vielleicht auch Glycerinaldehyd-PhS) entsteht. 3-Phosphoglycerinsäure ist von NEUBERG c. s. **94)** synthetisch hergestellt worden und MARTHE VOGT **95)** gelang auch die Zerlegung in die optisch-aktiven Komponenten, von denen die linksdrehende die biologisch in Frage stehende Form ist. Diese läßt sich durch Abstoppung ihrer weiteren Umsetzung mit Hilfe von NaF gewinnen ebenso wohl aus Hefenabbaugemischen (NILSSON **96)**, vereinfachte Darstellung von NEUBERG und KOBEL **97)**), wie aus Muskel (EMBDEN c. s. **98)**). Es zeigte sich nun (NEUBERG c. s., BARRENSCHEEN (l. c. 104b)), daß Phosphoglycerinsäure durch gewöhnliche Phosphatasen (Taka, Niere, Knochen) hydrolytisch gespalten wird in PhS und Glycerinsäure. Dasselbe ließ sich auch an Hefe nachweisen; aber in der Hauptsache verläuft, wenn ein Zymasesystem + Cozymase vorhanden ist, die Reaktion anders, es entsteht, wie gleichzeitig EMBDEN c. s. **98)** und MEYERHOF **99)** im Muskelextrakt, MEYERHOF bei Hefe zeigten, ganz überwiegend Brenztraubensäure.

Denselben Abbau fanden dann NEUBERG und KOBEL **97)** bei obergäriger Hefe, SCHUCHARDT **101)** bei frischer untergäriger Hefe, bei *B. coli* ANTONIANI **102)**, bei Thimothee-Bakterien CATTANEO **103)**, bei gekeimten Erbsen und Bohnen NEUBERG und KOBEL **104)**.

---

93) ***O. Meyerhof, K. Lohmann,*** Enzym. Gleichgew. zw. Hexosephosphors. u. Dioxyaceton-PhS. Bioch. Zs. **271**, 89, **273**, 73 (1934). — 93a) ***W. Kiessling,*** Synth. der Dioxyaceton-PhS. Ber. Chem. Ges. **67**, 869 (1934). — 93b) ***C. Neuberg, M. Kobel,*** Auftreten von Triose b. desmolyt. Hexosenabbau. Bioch. Zs. **269**, 441, **272**, 445 (1934). — 93c) ***T. Baba,*** Abbau des Hexosephosphats durch ... Tabakblätter. ebd. **275**, 248 (1935). — 94) ***C. Neuberg, F. Weinmann, M. Vogt,*** Synth. v. Glycerins.-Monoph. Bioch. Zs. **199**, 248 (1928). S.A. — 95) ***M. Vogt,*** Glycerins.-Monoph. Bioch. Zs. **211**, 1 (1929). S.A. — 96) ***R. Nilsson,*** Stud. üb. den enzym. Kohlenhydratabbau. Ark. Kemi 10 A. Nr. **7**, S. 121 (1930). — 97) ***C. Neuberg, M. Kobel,*** Überführ. der Phosphoglycerinsäure in Brenztraubens. Bioch. Zs. **260**, 24, **263**, 219, **264**, 456 (1933). S.A. Ang. Chemie **1933**, 711. S.A. — 98) ***G. Embden, H. J. Deuticke, G. Kraft c.s.,*** Vork. opt. akt. Phosphoglycerins. etc. Klin. Ws. **1933**, 213; Zs. phys. Chem. **230**, 1—108 (1933). — 99) ***O. Meyerhof, W. Kiessling,*** Auftreten etc. der Glycerinsäure-PhS etc. Bioch. Zs. **264**, 40 (1933). — 100) ***O. Meyerhof, W. Kiessling,*** Phosphoryl. Zwischenprod. ... d. alkohol. Gär. Bioch. Zs. **267**, 313 (1933). — 101) ***W. Schuchardt, A. Vercellone,*** Abbau der (—) Monophosphoglyc. etc. Bioch. Zs. **272**, 434 (1934). S.A. — 102) ***Cl. Antoniani,*** Umwandl. der Phosphoglycerins. durch B. coli. ebd. **267**, 376 (1933). S.A. — 103) ***C. Cattaneo,*** Einw. von Thimothee-Bakt. auf Glycerins.-Monoph. Bioch. Zs. **270**, 382 (1934). S.A. — 104) ***C. Neuberg, M. Kobel,*** Umw. von Phosphoglyc. durch Ferm. gekeimter Erbsen etc. ebd. **272**, 457 (1934). S.A.

Dieser selbe Übergang in Brenztraubensäure ließ sich auch in anderen tierischen Geweben nachweisen, so in hämolysirten B. K., Acetontrockenpulvern von Niere, Leber, Rattensarkom (BRAUNSTEIN **104a**)). Auch BARRENSCHEEN **104b**) fand die Reaktion in Muskel, Leber, hämolysirten B. K., aber nicht in Niere und Knochen, die nur phosphatatisch spalten. In gealterten Geweben hört bei erhalten gebliebener einfacher Phosphatase-Wirkung die Umwandlung in Brenztraubensäure auf, läßt sich aber durch „Cozymase", d. h. Adenylpyro-PhS + Mg wieder herstellen, mit solchem Zusatz auch bei Niere nachweisbar, nicht bei Knochen. NaF hemmt, Bromessigsäure und Cyanid nicht. Die Reaktion ist bei B.K. nach SCHUCHARDT (l. c. 114) wechselnd und meist geringfügig. Es enthalten also alle Gewebe außer Knochen das oxydoreducirende Enzymsystem, das bei Zusatz von Cozymase die zunächst abgespaltene Glycerinsäure in Brenztraubensäure umlagert. Auch aus Galaktose wird PhGlS durch angepasste Hefen gebildet, und ebenso zerlegt (CATTANEO **105**)); ebenso auch aus Saccharose und Maltose (BABA **106**)).

Dieser Abbau ist neben der Dephosphorylirung eine Dehydratisirung, indem sich aus Glycerinsäure die Enolform der Brenztraubensäure bildet; er läßt sich ebenso wie an Glycerinsäure selbst auch an der Phosphoglycerinsäure rein chemisch durch Kaliumpyrosulfat erzielen (**107**), wenn auch in geringerer Ausbeute. Unter biologischen Bedingungen scheint aber überhaupt keine einfache Dephosphorylirung einzutreten: die „Phosphatase" des Zymasesystems wirkt überhaupt nicht nachweisbar auf die Phosphoglycerinsäure, da eine andere Reaktion schneller ist: es entsteht zuerst Phosphobrenztraubensäure durch Dehydratisirung des ganzen Moleküls (LOHMANN u. MEYERHOF **108**)); s. u.

Diese Reaktion Phosphoglyc. $\rightleftarrows$ Phosphobrenztr. ist eine echte Gleichgewichtsreaktion, das Gleichgewicht liegt bei 20° (Muskelextrakt oder ausgewaschene Trockenhefe) bei 71 % Phosphoglycerinsäure, mit steigender Temp. wird es nach rechts verschoben. Diese Reaktion ist es, die durch Fluorid gehemmt wird.

Als Zwischenstufe auf diesem Wege, der eine Wanderung der PhS von der 3-Stellung in die 2-Stellung voraussetzt, haben nun MEYERHOF und KIESSLING **109**) die **2-Phosphoglycerinsäure** $HO \cdot CH_2 \cdot CH\ (OPO_3H_2) \cdot COOH$ isolirt, die also der β-Glycerol-PhS entspricht und aus dieser auch synthetisch dargestellt werden kann (KIESSLING **110**)). Sie ist rechtsdrehend und steht mit der linksdrehenden 3-Phosphoglycerinsäure unter Wirkung von dialysirtem Muskelsaft in einem Gleichgewicht, auch der aus Muskel und Hefe isolirten 3-Phosphoglycerinsäure ist immer die 2-Säure beigemengt. Das Gleichgewicht ist bei 28° $\frac{\text{3-Säure}}{\text{2-Säure}} = 3{,}85$, bei 0° 7,3, bei 60° 2,3.

Auch die **Diphosphoglycerinsäure**, an beiden Hydroxylen phosphorylirt, ist ein biologisch vorkommender, dem Zuckerabbau entstammender Stoff; z. B. aus Erythrocyten von GREENWALD **111**) isolirt und von JOST **112**) näher untersucht. Gegen Gewebs-

---

104a) ***A. E. Braunstein,*** Phosphoglycerase der roten B.K. Bioch. Zs, **272,** 21 (1934). — 104b) ***H. K. Barrenscheen, H. Beneschovsky,*** Theorie der Glykolyse. ebd. **265,** 159 (1933), **276,** 147 (1935). S.A. — 105) ***C. Cattaneo,*** Phosphoglycerins. aus Galaktose. Bioch. Zs. **267,** 456 (1933). S.A. — 106) ***T. Baba,*** Bioch. Bild. opt. akt. Phosphoglycerins. aus versch. Zuckern. Bioch. Zs. **267,** 452 (1933). S.A. — 107) ***C. Neuberg, M. Kobel,*** Rein chem. Überf. der Glycerinsäure in Brenztr. Bioch. Zs. **272,** 459 (1934). S.A. — 108) ***K. Lohmann, O. Meyerhof,*** Enzym. Umwandl. von Phosphoglyc. in Brenztraubens. Bioch. Zs. **273,** 60 (1934). S.A. — 109) ***O. Meyerhof, W. Kiessling,*** Neues phosph. Intermediärprodukt. Naturw. **1934,** 838. ***Dies.,*** Isol. der isomeren Phosphoglycerins. etc. Bioch. Zs. **276,** 239 (1935). S.A. — 110) ***W. Kiessling,*** Synthese der isomeren Glycerinsäure-Phosphors. Ber. Chem. Ges. **68,** 243 (1935). S.A. — 111) ***J. Greenwald,*** New type of phosph. acid comp. isol. from blood. Jl. of Biol. Chem. **63,** 339 (1925). — 112) ***H. Jost,*** Biol. Bedeut. des säurelösl. organ. Blutphosphors. Zs. phys. Chem. **165,** 171, auf S. 201 (1927).

phosphatasen verhält sie sich abweichend von der einfachen Phospho-glycerinsäure. JOST fand eigentlich nur Nierenferment kräftig wirksam; Leber setzt nur 14—17 %, Muskel 7—9 %, Blut so gut wie garkeine PhS frei. Auch ROCHE **112a)** fand mit den meisten Organfermenten nur geringe Spaltungsgrade (9—17 %). Jedoch fanden dann BODANSKY c. s. **113)**, daß auch Darmph. und sogar sehr schnell vollständig spaltet, und daß auch Vollblut, d. h. incl. Serum, obzwar langsam, doch vollständig hydrolysirt.

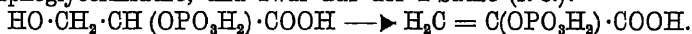
Die Sache hat sich dann dahin aufgeklärt, daß nach BRAUNSTEIN (l. c. 104a) und SCHUCHARDT c. s. **114)** Diphospho-glycerinsäure gegen die Ph. der Erythrocyten aller untersuchter Warmblüter (auch Vögel) fast völlig resistent ist (Spaltung nur bis 6 %). Es zeigt sich also, daß dieses Enzym, das vielleicht mit der „sauren" Ph. BAMANN's identisch ist, auch in der Wirkung abweicht. Eine genauere Untersuchung gegen andere Ester mit zwei PhS-Gruppen wäre sehr interessant. Die „alkalische" Gewebsph. spaltet hingegen glatt die beiden PhS ab.

Taka verhält sich wieder anders; die Ph. spaltet zwar beide PhS-Gruppen ab, aber es zeigt sich auch hier die von ASAKAWA **115)** gefundene ph-Verschiebung zwischen α- und β-Estern der PhS; denn KOBAYASHI **116)** fand für die Abspaltung der beiden Gruppen wieder die beiden ph-Optima bei 8 für die β-, und bei ca. 5,5 für die α-Gruppe.

Diese enzymatisch einfachen Verhältnisse werden aber überall dort verdunkelt, wo ein oxydo-reducirendes System vorliegt. Hier entsteht aus Diphosphoglycerinsäure ebenfalls Brenztraubensäure, wie zuerst NEUBERG c. s. **117)** bei Hefe fanden; jedoch ist auch die geringfügige Spaltung durch Erythrocyten, ebenso wie die energische durch andere Gewebssäfte mit Übergang in Brenztraubensäure verbunden, wenn auch in sehr wechselndem Maße auch bei derselben Tierart.

So geben SCHUCHARDT c. s. **114)** (II) an, daß bei 12 Pferden die roten B.K. nur in 4 Fällen erhebliche, in 8 weiteren geringe Mengen Brenztraubens. ergaben. Wesentlich ist, daß grade das Hauptorgan des phosphorylirenden Zuckerstoffwechsels, der Muskel, die größten Mengen Brenztraubensäure ergibt, Leber und Hirn nur wenig oder garnichts. Tumorgewebe wirken kräftig.

Phosphobrenztraubensäure entsteht nach LOHMANN und MEYERHOF (l. c. 108) aus Phosphoglycerinsäure, und zwar aus der 2-Säure (s. o.):

$HO \cdot CH_2 \cdot CH (OPO_3H_2) \cdot COOH \longrightarrow H_2C = C(OPO_3H_2) \cdot COOH.$

Synthese mit Strukturbeweis der Enolform KIESSLING **117a)**.

Erst diese Substanz soll unter Einfluß von Phosphatase + Cozymase in Brenztraubensäure übergehen (einfache Hydrolyse in $H_2C = C(OH) \cdot COOH$).

Die **Phospho-l-milchsäure** hat WAGNER-JAUREGG **117b)** synthetisch hergestellt. Sie hat aber kein biologisches Interesse: sie wird weder von Phosphatasen noch von Dehydrasen angegriffen. Bei dieser Stufe des Abbaus gibt es also keine biologische Phosphorylirung mehr.

Hexosephosphate. Die im H.W. noch als wahrscheinlich angesehene größere Anzahl chemisch schwer zu definirender Ester ist ebensowenig vorhanden wie essentielle Strukturverschiedenheiten zwischen den Estern, die bei der Hefengärung und im Muskel

---

112a) ***J. Roche***, Blood phosphatases. Biochem. Jl. **25**, 1724 (1931). S.A. Bull. Soc. Chim. Biol. **13**, 841 (1931). — 113) ***O. Bodansky, H. Bakwin***, Phosphatase hydrol. of diphosphoglyceric. acid. Jl. of Biol. Chem. **104**, 747 (1934). — 114) ***W. Schuchardt, A. Vercellone***, Verh. von opt. akt.... Diphosphoglyc. Bioch. Zs. **272**, 437 (1934), **275**, 261, **276**, 280 (1935). — 115) ***K. Asakawa***, Ferm. Spalt. versch. PhS-Ester. Jl. of Biochem. **11**, 143 (1929). S.A. — 116) ***H. Kobayashi***, Ferm. Spalt. der Diphosphoglycerins. Jl. of Biochem. **11**, 173 (1929). — 117) ***C. Neuberg, W. Schuchardt, A. Vercellone***, Umwandl. von Glycerins.-Di-PhS. Bioch. Zs. **271**, 229, **272**, 435 (1934). S.A. — 117a) ***W. Kiessling***, Synth. der (Enol)-Brenztraubensäure-PhS. Ber. Chem. Ges. **68**, 597 (1935). — 117b) ***Th. Wagner-Jauregg***, Phospho-l-milchsäure. Ber. Chem. Ges. **68**, 670 (1935).

entstehen. Vor allem ist es eine Vereinfachung, daß das chemisch so rätselhafte Lactacidogen Embdens (H.W. §§ 290, 808) als besonderer Stoff endgiltig gestrichen werden kann: es ist ein unter bestimmten Bedingungen präparativ herauszufischendes Gleichgewicht der chemisch nunmehr bekannten Ester; dasselbe gilt, wenn auch nicht so betont, für die anderen ursprünglich als chemische Individuen angesehenen Ester.

Zunächst sei kurz erwähnt, daß auch 6-Mannose-PhS als Nebenprodukt gewonnen werden kann (Robison **118**), Patwardhan **118a**)), als Zeichen stattgehabter Umlagerungen Glucose ⇄ Fructose über die allen 3 Zuckern gemeinsame Enolform. Sie entsteht am reichlichsten aus Mannose selbst mit Trockenhefe bei 38°; auch mit frischer Hefe, neben Zymophosphat (J. Neuberg c. s. **119**)). Auch Galaktose liefert neben Zymophosphat ein bisher nicht näher bekanntes Monophosphat (Nilsson **120**)); jedoch hält Nilsson es für wahrscheinlich, daß dieses nur aus dem KH. der Hefe selbst entsteht. Hofmann **121**) fand neben Zymophosphat einen etwas anderen, aber nicht rein zu erhaltenden Monoester.

Davon abgesehen gibt es bisher drei definirte Monophosphate und ein Diphosphat. Die ersteren treten in drei biologisch charakterisirten Mischungen auf, die man nach ihren Entdeckern bezeichnet.

Der **Embden-Ester** ist das früher so bezeichnete **Lactacidogen.** Zur bequemeren Darstellung s. Lohmann **122**). Er entsteht auch durch dialysirtes Muskelextrakt (Mg als Aktivator) aus Fructose-di-phosphat, also zunächst durch einfache Abspaltung einer PhS, wobei aber auch schon Umwandlungen stattfinden müssen, denn das eigentliche Spaltprodukt ist der Neuberg-Ester; aber dieser lagert sich im Muskelextrakt in wenigen Sekunden in den Embden-Ester um (Lohmann **123**)). Für das reine Phosphatase-Problem ist die Feststellung Lohmann's sehr wichtig, daß der Embden-Ester im Muskelextrakt nicht weiter hydrolytisch dephosphorylirt wird; nur bei Gegenwart von Cozymase wird er weiter umgewandelt, aber eben in ganz anderer Weise in Milchsäure übergeführt.

Der **Robison-Ester** kann ebenfalls rein biologisch aus Zuckerabbaugemischen isolirt werden, zunächst aus gärenden Hefemacerationssäften (Robison **124**)); Darstellung in größerer Ausbeute Neuberg **125**). Er entsteht auch als Nebenprodukt bei der Zerlegung von Zymophosphat, wenn die PhS in 1 abgespalten wird. Über die enzymatische Zerlegung s. außer in den Arbeiten Robison's noch Takahashi (Knochenenzym) **126**) und Eichholtz **127**) (Niere). Über die besondere Bedeutung der starken Spaltung durch Knochenphosphatase s. § 292.

Der **Neuberg-Ester** entsteht durch — rein chemische oder enzymatische — partielle Dephosphorylirung aus dem Fructose-di-phosphat (s. u.) (*Neuberg l. c. 43b*). Er ist also nach seiner Gewinnung nur ein halb physiologisches Produkt; er entsteht aber allem Anschein nach auch in den Abbaugemischen, nur lagert er sich sehr schnell in den Embden-Ester um (Lohmann **123**)).

---

118) ***R. Robison*** (***C. M. Jephcott***), Mannose-monophosphate I, II. Biochem. Jl. **26**, 2191 (1932). **28**, 1844, (1934) S.A. — 118a) ***V. N. Patwardhan,*** dass. III. ebd. **28**, 1854 (1934). S.A. — 119) ***Irene St. Neuberg, Cl. Ostendorf,*** Verhalten der d-Mannose etc. Bioch. Zs. **221**, 154 (1930). S.A. 120) ***R. Nilsson.*** Stud. üb. den enzym. Kohlenhydratabbau. Ark. Kemi **10** A Nr. 7. S. 50. — 121) ***E. Hofmann,*** Phosphor. durch Lactosehefen. Bioch. Zs. **265**, 203 (1933). — 122) ***K. Lohmann,*** Isol. verschied. natürl. Phosphors.-Verbind. etc. ebd. **194**, 306 (1928). — 123) ***K. Lohmann,*** Phosphoryl. u. Dephosphoryl. ebd. **262**, 137 (1933). S.A. — 124) ***R. Robison,*** A new phosphor. ester by the act. of yeast juice on hexoses. Biochem. Jl. **16**, 809, **17**, 286, **18**, 740, 755 (1922/4). — 125) ***C. Neuberg, J. Leibowitz,*** Durch Gär. gewonn. Hexose-monophosphat. Bioch. Zs. **184**, 489 (1927). — 126) ***Y. Takahashi,*** Enzym. Zerleg. von Hexose-monoph. ebd. **146**, 161 (1924). — 127) ***F. Eichholtz,*** Hydrol. organ. Phosphorsäure-Ester. Verh. D. Pharm. Ges. (Arch. für exp. Path. **111**), 73 (1926).

Alle diese drei Ester sind, wie ROBISON für seinen Ester von Anfang annahm, Gemische (MEYERHOF und LOHMANN **128)**); sie enthalten sämtlich Aldose- und Ketose-PhS, auch (trotz seiner Darstellung aus dem reinen Fructosephosphat) der NEUBERG-Ester; die gegenseitigen Umwandlungen werden durch eine besondere Kinase bewirkt (l. c. 144a); Näh. im „Nachtrag" am Schluß von H. T. VII.

Die Zerlegung des ROBISON-Esters in Glucose-Ph. und Fructose-PhS, daneben noch weitere Ketose-PhS (s. u.) haben ROBISON und KING **130)** durchgeführt. Spektroskopisches Verhalten (auch Zymophosphat) NEUBERG **131)**; starke Absorptionsbande bei 2680 Å, die auf freies —CO— deutet.

Chemische Zusammensetzung. In den drei Estern kommen (vom Mannosephosphat abgesehen) dieselben Aldosephosphate und Ketosephosphate vor, aber in ganz verschiedenen Mischungen. Relativ am einfachsten ist der NEUBERG-Ester, der — wenigstens bei der Herstellung durch Säurehydrolyse aus Zymophosphat — nur aus einer Ketose-PhS besteht. Dagegen bestehen EMBDEN-Ester und ROBISON-Ester vorwiegend aus Aldose-PhS (EMBDEN-Ester zu 75—80 % **(128)**, ROBISON-Ester zu 55—68 % **(130)**). Bis vor kurzem glaubte man, daß nur je eine Aldose-PhS und eine Ketose-PhS darin enthalten ist, neuerdings aber ergab die enzymatische Zerlegung des Zymophosphates unter Bedingungen, wie sie auch zum EMBDEN-Ester führen, eine weitere Fructose-PhS, die also wohl sicherlich zum mindesten im EMBDEN-Ester, wahrscheinlich aber auch im ROBISON-Ester enthalten ist. Alle die drei nunmehr bekannten Monophosphate der Zucker gehen leicht ineinander über, wobei dann auch die Nebenprodukte (Mannose- und Trehalose-PhS) entstehen. Von welchem Ester man ausgeht, einschl. Zymophosphat, erhält man durch Hefe immer dieselben Gemische (NEUBERG **132)**). Die Aldose-PhS, die den Hauptbestandteil des EMBDEN- und des ROBISON-Esters bildet, ist eine Glucose-PhS, deren Struktur nach mannigfachen irrigen Annahmen über die Stellung der PhS zuerst von OHLE **133)** richtig gedeutet, dann von ROBISON und KING **130)**, sowie KING c. s. **134)** als Glucose-6-PhS erwiesen wurde, identisch mit der durch Synthese über Acetonglucose erhaltenen Glucose-6-PhS (LEVENE **135)**). Spaltung durch Knochenphosphatase liefert Glucose, neben Fructose; auch die durch Oxydation mit Br hergestellte Hexonsäure des ROBISON-Esters ist durch Phosphatase spaltbar.

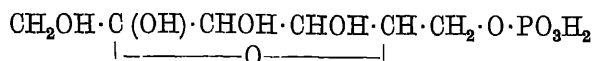
Da die 6-Stellung besetzt ist, ist dadurch die Frage noch nicht entschieden, ob die Glucose <1,4> oder <1,5>, furoid oder pyroid ist. Es ist dies auch heute noch nicht klar, da die Methylirung je nach den Bedingungen auf furoide oder pyroide Struktur schließen läßt. Für die furoide Struktur, also die einer am-Glucose spricht, daß bei niedriger Temp. bei der Methylirung der <1,4> Ring bestehen bleibt (KING **134)**), jedoch hält ROBISON selbst den Ester für pyroid. Glucose-6-PhS entsteht auch aus Stärke beim erst diastatischen Abbau, dann mit Säure (l. c. 79a).

Eine von SABETAY **136)** aus Saccharosephosphat durch Säurespaltung hergestellte Glucose-PhS ist mit dieser nicht identisch; bei der Osazonbildung wird die PhS abgespalten. Spaltbar durch Hefe und Taka.

128) ***O. Meyerhof, K. Lohmann,*** Enzym. Milchsäurebild. im Muskelextrakt IV. Spalt. d. Hexosemonophosphors. Bioch. Zs. **185,** 113 (1927). — 130) ***R. Robison, E. J. King,*** Hexosemonophosph.-esters. Biochem. Jl. **25,** 323 (1931). S.A. — 131) ***C. Neuberg, S. A. Schou,*** Strukt. der Hexose-PhS etc. Bioch. Zs. **191,** 466, (1927). — 132) ***C. Neuberg, J. Leibowitz,*** Enzym. Umw. von Hexose-di-Phosph. etc. Bioch. Zs. **187,** 481, **191,** 450, 456 (1927). — 133) ***H. Ohle.*** Neue Erg. der Zuckerforsch. Zs. Ang. Chem. **1930,** 217. — 134) ***E. J. King, R. R. Mac Laughlin, W. Th. J. Morgan,*** Methyl. of hexosemonophosph.-ester. Biochem. Jl. **25,** 310 (1931). — 135) ***P. A. Levene, A. L. Raymond,*** Hexosemonophosphates. Jl. of Biol. Chem. **89,** 479, **91,** 751, **92,** 757 (1931/2). S.A. — 136) ***M. Sabetay, L. Rosenfeld,*** Glucose-Phosphorsäure. Bioch. Zs. **162,** 469 (1925).

Was die angebliche Glucose-PhS ist, die MORII 137) durch Synthese aus den Komponenten mit Hilfe einer nur im Extrakt tuberkulöser Lymphknoten vorgefundenen Phosphatase zu 3 % erhalten hat, ist mangels einer Nachprüfung nicht festzustellen.

Der Hauptbestandteil des NEUBERG-Esters ist nach LEVENE **138)** eine Fructofuranose-6-phosphorsäure:

$$CH_2OH \cdot C\,(OH) \cdot CHOH \cdot CHOH \cdot CH \cdot CH_2 \cdot O \cdot PO_3H_2$$
$$\text{|———O———|}$$

Die furoide Struktur ergibt sich aus der glatten Abspaltung einer PhS in 1, die schon NEUBERG **139)** erwiesen hatte, aus dem Zymophosphat, das nach seiner Struktur (PhS in 1 und 6) ja nur furoid sein kann, so daß auch das Mono-Phosphat nur <2,5> sein kann. Infolge dieser furoiden Struktur ist aber der NEUBERG-Ester sehr empfindlich. Wirklich fast einheitlich entsteht er nur bei der Säurehydrolyse. Bei der enzymatischen Spaltung des Zymophosphats hängt die Zusammensetzung ganz vom Enzymmaterial ab. Sie ist erkennbar an der Drehung (NEUBERG-Ester schwach, ROBISON-Ester stärker rechts). Den reinsten Ester liefert Taka (+ 4,5), Hefe einen von 5—10 und Nierenphosphatase + 23° (NEUBERG u. LEIBOWITZ l. c. 133). Dieser letztere Ester ist nun praktisch schon mit dem ROBISON-Ester identisch; toluolisirte Hefe liefert also ein Gemisch beider Ester. Wenn man aber Arsenat zusetzt, das das zymatische System ausschaltet, die Phosphatase aber aktivirt (§ 289a), so liefert auch Hefe fast reine Fructose-PhS ($[\alpha]_D = +2{,}2°$) **(140)**.

Daß mit Muskelextrakt endgiltig der EMBDEN-Ester erhalten wird, ist mehrfach erwähnt (LOHMANN l. c. 123). Damit dürfte auch die ältere Beobachtung von BRUGSCH **141)** gedeutet sein, der bei Spaltung durch Trockenmuskel (und -Leber) aus Hexose-di-PhS einen Ester erhielt, der weder NEUBERG-Ester noch ROBISON-Ester war, während er in anderen Versuchen (Muskel) fast reinen ROBISON-Ester erhielt. Auch Blätter von Zuckerrüben enthalten ein Gemisch von Glucose- und Fructose-PhS, wohl als Vorstufe des Rohrzuckers **(141a)**. Der NEUBERG-Ester wird durch alle Phosphatasen zerlegt; neuere Versuche von IMANISHI **142)** (bei NEUBERG) zeigen eine Spaltung von 80 % durch Taka, Hefenmacerationssaft bis 98 %, frische Hefe 91 %.

Damit schien die Chemie dieser beiden Ester im wesentlichen abgeschlossen, während das Verhalten des EMBDEN-Esters die Wahrscheinlichkeit offen ließ, daß noch weitere Monophosphate unaufgeklärter Art darin enthalten sind (z. B. EMBDEN **143)**). Nun entsteht der EMBDEN-Ester nach LOHMANN (l. c. 123) auch durch Aufspaltung von Zymophosphat im Muskelextrakt; unter ganz ähnlichen Bedingungen (Aufspaltung mit Knochenphosphatase) entsteht ein zweites linksdrehendes (—39°) Fructosephosphat (MACLEOD und ROBISON **144)**, **144a)**), und zwar **Fructopyranose-1-PhS.** Es wird also die PhS in 6 abgespalten, und gleichzeitig tritt dabei eine Umlagerung von am-Fructose zu n-Fructose < 2,6 > ein; außerdem bildet sich auch bei dieser scheinbar so glatten Spaltung noch das Glucose-6-phosphat des EMBDEN- und ROBISON-Esters, ebenso wie sich nach LOHMANN der NEUBERG-Ester im Muskelextrakt blitz-

---

137) ***M. Morii,*** Synth. der Glykose-PhS durch T-B Phosphatase, Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. 2, 19 (1931); BPh 67, 376. — 138) ***P. A. Levene, A. L. Raymond,*** Hexosediphosphate. Jl. of Biol. Chem. **80**, 633 (1928). S.A. — 139) ***C. Neuberg, E. Reinfurth,*** Bez. der Hexosemonophosphors. etc. Bioch. Zs. **146,** 589 (1924). — 140) ***C. Neuberg, J. Leibowitz,*** Arsenataktivir. v. Phosphatasen. ebd. **191,** 460 (1927). — 141) ***Th. Brugsch c.s.,*** Hexosediphosphatase der Musk. etc. ebd. **164,** 199 (1925), **175,** 120 (1926). — 141a) ***J. Burkard, C. Neuberg,*** Entsteh. des Rohrzuckers. Bioch. Zs. **270,** 229 (1934). S.A. — 142) ***Y. Imanishi,*** Phosphatase. Bioch. Zs. **247,** 406 (1932). — 143) ***G. Embden, M. Zimmermann,*** Ch. des LactacidogensV. Zs. phys. Chem. **167,** 114 (1927). — 144) ***M. Macleod, R. Robison,*** Hydrol. of hexosephosph. acid. Biochem. Jl. **27,** 286 (1933). S.A. — 144a) ***B. Tankó, R. Robison,*** dass. II. ebd. **29,** 961 (1935). S.A.

schnell in den EMBDEN-Ester umlagert. Dies ist das Werk einer besonderen Kinase (l. c. 144a). Näh. im „Nachtrag" am Schluß des H. T. VII. Es ist also zweifellos, daß alle bisher bekannten chemischen definirten Ester unter biologischen Bedingungen — wozu schon Muskelextrakt + Mg ausreicht, — in ganz bestimmte Gleichgewichte von Hexose-monophosphaten übergeführt werden, bei denen die Glucose-6-PhS überwiegt, so daß also der ROBISON-Ester etwa dem idealen Gleichgewicht entspricht, während die anderen, und besonders der NEUBERG-Ester, nur als chemisch-präparativ stabilisirte Phasen anzusehen sind. Wir kennen solche Phasen (abgesehen von der sekundär auftretenden Trehalose-PhS) einschließlich der bevorzugten Glucose-6-PhS nun schon 4, und vielleicht lassen sich noch mehr isolieren. Die von den chemischen Bedingungen abhängige Zusammensetzung dieser Gleichgewichte läßt vermuten, daß keine der chemisch isolirten Phasen das wahre Durchgangsprodukt des Zuckerabbaues über die Phosphorylirung zu den (phosphorylirten oder P-freien) C_3-Stufen ist, daß vielmehr das eigentliche aktive Zwischenprodukt ein höchst labiler Phosphorsäure-Ester einer anderen Form ist, wahrscheinlich der der Fructose, Glucose und Mannose gemeinsamen Enolform, die vielfach als erste „Reaktionsform" der Zucker im Abbau angesehen wird, z. B. von NILSSON, HARDEN, OHLE. Darauf wird beim Kap. Zuckerabbau einzugehen sein; hier sei es nur deswegen betont, weil der Hinweis zeigt, daß die rein enzymatischen Spaltungen der verschiedenen Zuckerphosphate nur recht wenig für diese höchst verwickelten Abläufe ergeben können. Sie sind hier also nur in ihrer Bedeutung als Wirkungen der Phosphatasen zu schildern, ohne damit Wesentliches für den Zuckerabbau vorwegzunehmen. Und dazu ist hier zu sagen, daß Phosphatasen, welche die Hexosephosphate rein hydrolytisch zerlegen, grade dort nicht (oder nur in sehr geringfügiger Wirkung) vorhanden sind, wo der weitere Abbau dominirt, also bei Anwesenheit zymatischer Systeme. Zwar zerlegen die Phosphatasen der Niere, des Darmes etc. diese Ester ganz normal, aber in Muskelextrakten, Hefemaceraten etc. fehlen diese unspezifischen Phosphatasen; es finden ganz andere Umlagerungen statt, bei denen eine primäre einfache Abspaltung von PhS nicht anzunehmen ist, vielmehr noch PhS-haltige C_3-Körper entstehen (vgl. die Angabe bei EMBDEN-Ester, LOHMANN l. c. 123).

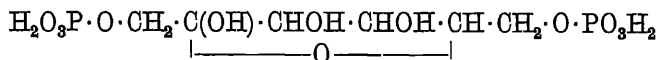
Das Hardensche Zymophosphat (H.W. §§ 290, 808 ff.). Der **Harden-Young-Ester**, das Zymophosphat, ist zuerst aus Hefegärgemischen isolirt worden, läßt sich aber überall auffinden, wo Zucker anoxybiontisch unter Phosphorylirung angegriffen wird (Muskel, Blut). Es ist heute noch das Hauptproblem völlig unklar und lebhaft umstritten, welche Rolle dieser Körper beim wirklichen Zuckerabbau in der lebenden Zelle spielt. Von der Annahme, daß es sich um ein biologisch ganz gleichgiltiges reines Stabilisirungsprodukt der eigentlichen Abbauphasen handelt (wie bereits H. W. S. 1456 angedeutet), bis zu der neuerdings wieder von EMBDEN und MEYERHOF verfochtenen Ansicht, daß es gradezu die Schlüsselsubstanz des „ersten Angriffes" ist, kann man alle Nüancen der Einschätzung in der Literatur finden. Darauf werden wir im XVIII H.T. in aller Ausführlichkeit eingehen.

Hier seien diese Dinge nur kurz erwähnt, um die Frage des Zymophosphates als Substrat etwaiger Phosphatasewirkungen zu erörtern. Andererseits gibt wieder sein Verhalten in bezug auf Dephosphorylirung oder Ausbleiben dieser Abspaltung von PhS wichtige Hinweise auf seine mögliche Rolle beim Abbau, so daß hier wie in diesem ganzen Abschnitt die Dinge schwer zu trennen sind. Das Zymophosphat ist nach z. T. bereits im H.W. erwähnten Vorarbeiten von YOUNG, NEUBERG, MEYERHOF und LOHMANN (l. c. 128) u.a. in seiner Struktur endgiltig von MORGAN und

ROBISON 145—147), sowie LEVENE und RAYMOND (l. c. 135) aufgeklärt worden.

Von MORGAN und ROBISON wurden die α- und β-Methyl-Glykoside des Zymophosphats dargestellt, die beide ebenfalls — durch Knochenphosphatase — völlig zerlegbar sind. Es wurden die freien Glykoside völlig methylirt und dadurch als Methylfructofuranoside erkannt. Daraus folgt die 1,6 Stellung, denn die PhS in 1 war bereits sichergestellt, da bei der Osazonbildung eine PhS abgespalten wird, die nur in 1 sitzen kann (NEUBERG u. REINFURTH l. c. 139). LEVENE und RAYMOND folgerten dasselbe aus der leichten Spaltbarkeit des Methylfructosids aus Zymophosphat, die ebenfalls für Fructofuranose charakteristisch ist.

Es ist ein Fructofuranose-1-6-Diphosphat

$$H_2O_3P\cdot O\cdot CH_2\cdot \underbrace{C(OH)\cdot CHOH\cdot CHOH\cdot CH}_{O}\cdot CH_2\cdot O\cdot PO_3H_2$$

Es ist also furoider Natur, es enthält alloiomorphe Fructose, und es ist symmetrisch an beiden Enden mit PhS belastet. Beide Umstände sind von hoher Bedeutung und sprechen indirekt für eine essentielle Anteilnahme des Zymophosphates am Zuckerabbau.

Denn die Umwandlung der stabilen n-Hexose in eine labile, vielleicht furoide „Reaktionsform" stellt in irgend einer Weise eines der Hauptmomente des „ersten Angriffes" der Zucker dar; und wo wir andererseits mit guten Gründen das Auftreten solcher „Reaktionsformen" von vornherein vermuten, wie beim Angriff glykolytischer Enzyme auf Stärke und Glykogen, da könnte eine solche Phosphorylirung die für den regulirten Ablauf der Vorgänge nötige temporäre Stabilisirung dieser Formen ebenso erklären, wie die Stabilisirung nach der im allerersten Akt erfolgten Umlagerung der n-Hexosen in die Reaktionsform. Dies ganz prinzipiell, auf die vielen Schwierigkeiten dieser Annahme können wir hier nicht einmal hinweisen.

Zweitens aber begünstigt die symmetrische Belastung zweifellos das ja doch irgendwann einmal nötige Auseinanderfallen der C_6-Kette in 2 C_3-Körper, sei es in Methylglyoxal oder Triose-PhS, wie dies ja beim isolirten Zymophosphat nachgewiesen ist: Übergang in Dioxyaceton-PhS (l. c. 93).

Und damit gelangen wir zu unserem engeren Phosphataseproblem zurück. Es gibt drei Möglichkeiten:

1) Das Zymophosphat wird total dephosphorylirt, es entsteht eine labile Hexose (zunächst am-Fructose), die nun P-frei sofort spontan oder durch spezifische Katalyse in 2 C_3-Körper vom Typus Glycerinaldehyd zerfällt, und weiterhin in den Typus Methylglyoxal übergeht. Für diese Möglichkeit, daß das Zymophosphat symmetrisch total dephosphorylirt wird, und eine am-Hexose als weiteres Zwischenprodukt im Abbau auftritt, gibt es keine experimentelle Stütze. Es ist zwar durch Säure-hydrolyse möglich, die gesamte PhS abzuspalten, wobei Fructose entsteht, aber das ist sicherlich schon deswegen kein physiologisches Modell, weil dabei Fructopyranose entsteht. Die enzymatische Hydrolyse aber verläuft zweifellos immer so, daß nur eine PhS abgespalten wird. Die Abspaltung der zweiten PhS geht entweder langsamer vor sich (Knochenenzym, Hefe u. dergl.) oder praktisch garnicht, wie bei den Muskelenzymen (KAY und ROBISON 148), LOHMANN l. c. 123), wo die Monophosphat-Stufe überhaupt

---

145) ***W. Th. J. Morgan***, α- und β-Methylhexoside-diphosph. acid. Biochem. Jl. **21**, 675 (1927). S.A. — 146) ***W. Th. J. Morgan, R. Robison***, Const. of hexosediphosph. acid. Biochem. Jl. **22**, 1270 (1928). — 147) ***W. Th. J. Morgan***, Const. of hexose-di-phosph. acid. Chem. and Ind. **48**, 144 (1929). — 148) ***H. D. Kay, R. Robison***, Act. of muscle enz. on the organ. phosph. of blood. Biochem. Jl. **18**, 1140 (1924). S.A.

nicht überschritten wird. Wir kommen also in jedem Falle erst zu den Monophosphaten, also zum Fall 2).

2) Vom Zymophosphat wird eine PhS abgespalten, wir kommen in normalen Abbau zu Hexose-mono-phosphaten. Die Abspaltung in 1 läßt sich durch Säuren und Phosphatase experimentell erzielen: es entsteht dabei eben der idealisirte „NEUBERG-Ester", d. h. die am-Fructose-6-PhS. Aber auch dieser Vorgang ist nicht eindeutig, wenn man in biologischen Medien arbeitet; dann entsteht erstens noch die n-Fructose-1-PhS in gleichem Ausmaß, durch direkte Abspaltung der PhS in 6, und ferner tritt eine ausgedehnte Isomerisirung zu Glucose-6-PhS, dem ROBISON-Ester ein. Mit anderen Worten: durch Muskelextrakt entsteht — wie LOHMANN (l. c. 123) zeigte — als greifbares Produkt der EMBDEN-Ester, nicht der NEUBERG-Ester. Eine hydrolytische Weiterzerlegung dieser Ester findet im Muskel und in Hefen garnicht oder ganz langsam statt, während sie durch alle unspezifischen Phosphatasen zerlegt werden, s. b. ROBISON-Ester. Grade dieser Umstand macht ja die Einordnung der Monophosphate in die Abbauvorgänge so schwierig. Ebensowenig wie aus dem Zymophosphat direkt, scheinen aus den Monophosphaten leicht angreifbare P-freie Hexosen durch hydrolytische Abspaltung der PhS zu entstehen. Wir haben hier nur die Möglichkeit anzunehmen, daß das Hexosephosphat in sich zerfällt, in einen Teil C_3-PhS und einen Teil C_3 ohne PhS, und beide weiter reagiren.

3) Es scheint aber auch dies nicht der Weg — oder nicht der Hauptweg — zu sein. Eine überaus interessante Entdeckung von MEYERHOF und LOHMANN (l. c. 93) weist einen völlig anderen Weg, bei dem die Phosphatase-Wirkung im Stadium der C_6-Körper überhaupt entfällt. Danach zerfällt das Zymophosphat ohne Abspaltung von PhS (was durch die symmetrische Belastung sehr leicht verständlich ist) in 2 C_3-Bruchstücke, nämlich Dioxyaceton-PhS, unter Wirkung eines rein desmolytischen Enzyms. An dieser beginnen dann erst die weiteren Verschiebungen, die über Phosphoglycerinsäure, Phosphobrenztraubensäure schließlich zu Brenztraubensäure, zu Milchsäure und zu Methylglyoxal führen. Das kann uns hier nicht weiter beschäftigen. Diese neue Auffassung des Zuckerabbaues beruht hauptsächlich auf der primären und essentiellen Bedeutung des HARDEN-YOUNG-Esters. Ist diese richtig erkannt, so fallen alle „Zuckerphosphatasen" in das Bereich der einfachen unspezifischen Phosphatasen und haben mit dem Zuckerabbau nichts mehr zu tun, da dieser an ihrer Wirkung — die um es zu wiederholen grade im Muskel etc. kaum nachzuweisen ist, — vorbeigeht und sich nur ganz besonderer, spezifischer Phosphatasen bedient, um, wie MEYERHOF und LOHMANN annehmen, auf der Stufe der Brenztraubensäure, endlich die Dephosphorylirung zu vollziehen, die aber auch dann nach MEYERHOF (l. c. 54a) keine reine Hydrolyse, sondern eine gekoppelte Umesterung der PhS an Kreatin ist. Inwieweit diese Annahme alles umfaßt, wieweit sie giltig ist, das kann natürlich erst im Kap. Zuckerabbau selbst auseinander gesetzt werden. Die überall aufzufindenden stabilen oder halbwegs stabilen dargestellten Monophosphate der Zucker hätten dann also gar keine Bedeutung im Zuckerabbau (des Muskels, von den anderen Organen können wir dies mit noch geringerer Sicherheit aussagen); vielmehr scheint nur ein labiles, bisher nicht gefaßtes Monophosphat, vielleicht der Enolform, zum Aufbau des Zymophosphates zu dienen (OHLE **148a**)). Die biologische Bedeutung der darstellbaren Monophosphate scheint vielmehr ganz betont im Transport der Phosphorsäure durch die Blutbahn an jene Stellen zu liegen, wo sie gebraucht

---

148a) ***H. Ohle***, Chemie der Monosaccharide und der Glykolyse, München 1931.

wird, vor Allem also zu den Knochen (§ 292), oder zum Zweck der Regulirung des P-Stoffwechsels, also zu den Nieren (§ 293). Es ist doch sicher kein Zufall, daß diese beiden Gewebe über besonders kräftige Phosphatasen verfügen; s. dazu § 290.

§ 287. 5) **Synthetische einfachere Substrate.** Die Phosphatase, als allgemeiner Begriff gefaßt, hat eine sehr weit ausgedehnte Spezifität. Sie spaltet Ester der sog. „Orthophosphorsäure" H_3PO_4 (diese falsche Bezeichnung können wir hier nicht entbehren, da es keine bessere gibt), wie die der Pyrophosphorsäure. Bedingung ist nur, daß es sich noch um Säuren handelt: nur die primären und sekundären Ester sind spaltbar, nicht die ausgeglichenen tertiären wie Trimethylphosphat. Hier zeigt sich ein charakteristischer Substratunterschied gegenüber den Lipasen.

Da die Enzyme auch anorganische Pyrophosphate spalten, so wird vielfach eine besondere „Pyrophosphatase" angenommen (§ 283). Wir wollen also auch hier die Pyrophosphate gesondert behandeln.

Einfache Phosphate: Monoester der aliphatischen Alkohole von Methyl bis Cetyl, ebenso der sekundären wie Methyl-propylcarbinol (NEUBERG **149**)), Isopropyl (ASAKAWA **150**)), Diaethyl-PhS (ASAKAWA **150**)); bestritten, s. u., Chlorderivate (MANAKA **151**)), Glykol (Synthese und Spaltung) (KAY **152**)).

Fettaromatische Ester (Benzyl etc.) (ASAKAWA **150**)); Alicylische (Borneol u. a.) (NEUBERG), Cyclohexanol (HORIUCHI **153**)), 1,2 und 1,3 Methylcyclohexanol, Borneol, Menthol (s. u.) (HOTTA **154**)). Alle diese Ester werden nur durch die „saure" Ph. gespalten (HOTTA). Di-Ester gemischt wie z. B. Methylpropyl-PhS-phenylester, Cyclohexanol-PhS-phenylester etc. HOTTA.

Aromatische Ester (Phenol etc.) IWATSURU **155**), Diphenyl-PhS (ASAKAWA, IMANISHI **156**)) u. ä., Diphenole etc. (MANAKA **151**)). Kernbromirte Thymole und Naphtole werden von beiden tierischen Ph. leicht zerlegt (**157**).

Die Salicylo-PhS ist nach MANAKA **151**) instabil, zerfällt bei ph = 5,5 ohne Ferment, nicht aber die Isomeren mit OH in meta oder para, ebensowenig die Salicylaldehyd-PhS. Der Zerfall erfolgt grade bei diesem ph, weil dann die 1 Dissoc. der PhS mit der Dissoc. der Salicylsäure zusammenfällt. Auch Salol-PhS zerfällt, aber weniger vollständig, in freie Salicylsäure, Phenol und PhS neben Salicylsäure-anhydrid-PhS. Der Phenylester der Salicylo-PhS ist ziemlich beständig (ARAI **158**)).

Resistent sind Mentholphosphate und die sekundäre Bornyl-PhS (JACOBSOHN **159—161**)) aber nur gegen die „alkalische" Gewebsphosphatase, nicht gegen die „saure" bei ph = 5,6 (HOTTA **154**)).

Nach ROCHE **162**) ist auch Diaethylphosphat gegen alle Enzyme resistent, wie dies bereits MARTLAND und ROBISON **163**) für Knochenph. angegeben hatten, während es nach

149) ***C. Neuberg, J. Wagner, K. P. Jacobsohn,*** Phosphatase etc. Bioch. Zs. **171,** 485, **199,** 498 (1926/8). — 150) ***K. Asakawa,*** Spalt. der verschied. PhS-Ester. Jl. of Biochem. **11,** 143 (1930). S.A. — 151) ***Ch. Manaka,*** Ferm. Hydrol. der versch. PhS-Ester etc. Jl. of Biochem. **14,** 191, 481 (1931). — 152) ***H. D. Kay,*** Enz. synth. of β-hydroxy-ethyl-dihydrogenphosph. Jl. of Chem. Soc. **1929,** 524. S.A. — 153) ***K. Horiuchi,*** Phytase etc. Jl. of Biochem. **14,** 163 (1931). S.A. — 154) ***R. Hotta,*** Spec. der Phosphatase. Jl. of Biochem. **20,** 341 (1934). S.A. — 155) ***R. Iwatsuru,*** Spalt. der monophenylphosph. Salze etc. Bioch. Zs. **178,** 348 (1926). — 156) ***Y. Imanishi,*** Phosphatase. Bioch. Zs. **247,** 406 (1932). — 157) ***S. Munemura,*** Phosphatase etc. Jl. of Biochem. **18,** 23 (1933). S.A. — 158) ***J. Arai,*** Spont. Spalt. der Salol-PhS etc. Jl. of Biochem. **20,** 465 (1934). S.A. — 159) ***K. P. Jacobsohn*** (Zusammenf.) Action de la phosphatase. Arch. Portug. des Sci. Biol. **3,** 151 (1932). S.A. — 160) ***K. P. Jacobsohn, J. Tapadinhas,*** Synth. des éthers acides du menthol. Soc. Biol. **104,** 432, 434, **105,** 152 (1930). — 161) ***Dies.,*** Spec. der Phosphatase. Bioch. Zs. **230,** 304 (1931). — 162) ***J. Roche,*** Spec. des phosphatases etc. Soc. Biol. **107,** 1144 (1931), Biochem. Jl. **25,** 1724 (1931). S.A. — 163) ***M. Martland, R. Robison,*** Bone phosphatase Biochem. Jl. **21,** 665 (1927).

YAMANE 164) von Knochenph. zerlegt wird, nach ASAKAWA 150) wird Diaethyl-PhS sowohl von Niere wie Taka gespalten. Isopropyl- und sek. Butyl-PhS verhalten sich nach HOTTA 154) wie die hydroaromatischen Ester, unspaltbar bei ph = 9. Zwischen primären und sekundären Alkoholen sind auch andere Unterschiede gefunden worden, so insbesondere im opt. ph (§ 289). So spaltet nach ASAKAWA 150) Taka bei ph = 3 sekundäre Alkohole schneller als primäre, bei 5,5 nicht; nach KOBAYASHI 165) gilt dies auch dort, wo beide Ester an einem Körper vertreten sind (Diphosphoglycerinsäure); hier wird die Ablösung der PhS am β-C des Glycerols unter anderen Bedingungen vollzogen als die am α-C. Es hängt dies mit der Frage einer besonderen Phospho-di-esterase zusammen, die β-substituirte Phosphorsäure-Ester spalten soll (UZAWA 166), Näh. §§ 283, 285). Hier sei noch erwähnt, daß nach TAKAHASHI 167) auch die Hefennucleinsäure nur von der Diesterase, nicht von der Monoesterase angegriffen werden soll, besser gesagt soll die erste den Komplex aufpalten, die zweite die totale Abspaltung der PhS (von den Nucleotiden) vollenden. Er schließt daraus auf einen besonderen Bau der Nucleinsäure, bei der danach alle PhS doppelt substituirt sein sollen, s. bei Nucleasen.

Strukturspecifität. Eigenartige Unterschiede zwischen Isomeren fand v. BRÜCKE 168) bei Dikresylphosphaten. Taka zerlegt im natürlichen Milieu p viel langsamer als o und m, beim opt. ph (4,3) gleich schnell ; Schweineleber (ph = 6,5), ebenso Niere m und p > o. Isoamylalkohol ganz wenig schneller als d-Amylalkohol (2 Methylbutanol (1)) (primäre Ester) (v. FALKENHAUSEN 169)).

Pyrophosphate. Nachdem die Wirkung verschiedener Phosphatasen aus tierischen Geweben und Taka zunächst auf einige organische Ester der Pyro-PhS festgestellt war (s. u.), wurde auch erkannt, daß ebenso die einfachen Salze der Pyro-PhS zerlegt werden, wobei Orthophosphate entstehen (KAY 170)). Es ist indessen diese Frage insofern noch nicht restlos geklärt, als über die Natur der dabei mitwirkenden Enzyme Zweifel bestehen in dem Sinne, ob es eine ganz spezifische Pyrophosphatase gibt, die nichts anderes leistet, als die Sauerstoffbrücke der Pyro-Phosphorsäure aufzuspalten, gleichgiltig, ob diese anorganisch oder organisch gebunden ist.

Zuerst nahm man allgemein an, daß es sich hier nur um die Wirkung der allgemeinen Phosphatase handelt; und in diesem Sinne hat man zunächst auch den Nachweis der „Pyrophosphatspaltung" in solchen Geweben aufgefaßt, in denen Phosphorylirungsprozesse an den Zuckern stattfinden, also im Muskel (LOHMANN 171)), in Hefe (BOYLAND 172)) und in Erythrocyten (ENGELHARDT 173), BARRENSCHEEN 174)). Diese „Pyrophosphatfraktion", zunächst gekennzeichnet durch mit Säure leicht abspaltbaren P, hat sich aber später in der Hauptsache als Adenylpyro-PhS herausgestellt (§ 284); und für deren Spaltung ist ein ganz besonderes specifisches Enzym vorhanden, das einfache Pyrophosphate nicht angreift (§ 294). Wenn also trotzdem auch Pyrophosphate einfacherer Art in solchen Geweben gespalten werden, so muss nebenbei noch eine andere Pyrophosphatase vorhanden sein, und da die gewöhnliche unspezifische Phosphatase grade im Muskel praktisch fehlt, so scheint mir diese Frage für den Muskel noch nicht voll geklärt zu sein. KAY fand im Muskel schwache Wirkung. Die Angabe von LOHMANN 171), daß auch zugesetztes anorg. Pyrophosphat im Muskel in

164) ***T. Yamane***, Phosphatase etc. von Knochen u. Knorpel. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. 2, 49 (1931), BPh **66**, 638. — 165) ***H. Kobayashi***, Glycerophosphatase. Jl. of Biochem. **8**, 205, **10**, 147 (1927/8); **11**, 173 (1929). — 166) ***S. Uzawa***, Kleien-Phosphoesterase. Jl. of Biochem. **15**, 1, 11, 19 (1932). S.A. — 167) ***H. Takahashi***, Ferm. Dephosphoryl. der Nucleinsäure. Jl. of Biochem. **16**, 463 (1932). S.A. — 168) ***F. v. Brücke***, Phosphatat. Spalt. stellungsisomerer Diaryl-PhS. Bioch. Zs. **258**, 470 (1932). — 169) ***F. v. Falkenhausen***, Enz. Spalt. versch. Amyl-PhS. Biochem. Zs. **253**, 152 (1932). — 170) ***H. D. Kay***, Pyrophosphatase. Biochem. Jl. **22**, 1446 (1928). S.A. — 171) ***K. Lohmann***, Vork. und Ums. von Pyrophosphat in Zellen. Bioch. Zs. **203**, 172 (1928). — 172) ***E. Boyland***, Pyrophosphate in yeast prepar. Biochem. Jl. **24**, 350 (1930). — 173) ***A. Engelhardt***, Ortho- und Pyrophosphat . . . in Blutzellen. Bioch. Zs. **227**, 16 (1930). — 174) ***H. K. Barrenscheen, K. Braun***, Glykolyse des Blutes. ebd. **231**, 144 (1931).

Orthophosphat übergeführt wird, spricht natürlich auch zu gunsten eines solchen Enzyms auch im Muskel. Im übrigen zweifelt neuerdings Satoh **174a)** an der Besonderheit der Adenyl-pyrophosphatase, die er für eine Kombination von Pyrophosphatase mit Phospho-Esterase hält, s. § 294.

Spaltung anorganischer Pyrophosphate fand Lüers **175)** auch in Hefe und Malz. Auf eine Verschiedenheit der „Pyrophosphatase" von der allgemeinen Phosphatase hatte zuerst Kay **170)** wegen der verschiedenen Verteilung in den Organen geschlossen; dann hatte Jacobsen **176)** die Adenyl-pyrophosphatase als specifisch erkannt und sie (in Leberextrakten) von der Pyrophosphatase wie von den anderen Ph. getrennt. Mit Sicherheit ist die Sondernatur der Pyrophosphatase auch heute noch nicht entschieden, wenn auch die Schule Akamatsu's (vgl. § 283) dafür eintritt. Kurata (l. c. 180) und Takahashi **177)** behaupten nicht nur Wirkungsverschiebungen, Abweichungen im ph aufgedeckt zu haben, sondern sogar durch präparative Trennung ein Enzym erhalten zu haben, das nur auf Pyrophosphate wirkt; und es soll sogar unter den Pyrophosphatasen in diesem engeren Sinne wieder dieselben drei elektrochemisch verschiedenen Typen geben wie bei den Phospho-Esterasen (vgl. §§ 283, 289).

Sehen wir also von diesen Unklarheiten ab, und geben einfach die Tatsachen.

Die Spaltung wurde zuerst am Diphenylpyrophosphat erkannt (Neuberg, an Niere und Taka **178)**, Kay **170)**); jedoch soll grade dies (wegen der Hemmung durch Phenol?) nur zu knapp 30 % zerlegt werden (Tapadinhas **179)**) (Blattferment von *Euphorbia pulcherrima Willd.*). Bei Taka und Blut soll die Spaltung nicht auftreten (Kurata **180)**). Weiter Spaltung vom Kresol- und α-Naphtol-pyro-PhS, Difenchyl-pyro-PhS (Ochiai **181)**). Dimenthyl-pyro-PhS ist ebenso resistent wie die Ortho-PhS. (Jacobsohn l. c. 160).

Heterocyclische Ester: Pyrophosphat des di-o-Oxychinolins durch alle tierischen und pflanzlichen Enzyme (Hefe, Erbsenmehl, Leber, Niere) (Jacobsohn **182)**, Pereira **183)**.

Metaphosphorsaure Salze gehen durch Enzymwirkung in Orthophosphate über (Kitasato **184)**); an Estern nicht zu erfassen, da sie in wäss. Lösung von selbst zerfallen.

Anhang: Arsenatase. Atoxyl, p-Aminophenylarsinsäure, wird durch ein Enzym aus Fettgewebe unter Freisetzung von Arsenat zerlegt (Quagliariello **185)**).

Konfigurations-Specifität. Das Material ist hierfür noch recht spärlich, jedoch ausreichend, um ihre Existenz qualitativ zu sichern. Zuerst fanden Neuberg c. s. **186)** beim primären Borneolphosphat ein schnelleres Abbauen des l-Esters zu Beginn, während der d-Ester langsamer folgt; Gualdi **187)** bestätigte dies für tierische Phosphatase.

174a) ***T. Satoh,*** Hydrol. der Adenosin-tri-PhS. etc. Jl. of Biochem. **21,** 19 (1935). S.A. — 175) ***H. Lüers, B. v. Zychlinsky, Kj. Bengtsson,*** Pyrophosphatase der Hefe etc. Ws. Brau. **48,** 519 (1931). — 176) ***E. Jacobsen,*** Specif. Adenyl-pyrophosphatase. Bioch. Zs. **242,** 292 (1931). — 177) ***H. Takahashi,*** Pyrophosphatase. Jl. of Biochem. **16,** 447 (1932) S.A. — 178) ***C. Neuberg, J. Wagner, K. P. Jacobsohn,*** Phosphatase etc. Bioch. Zs. **171,** 485, **188,** 227, **199,** 498 (1926/8). — 179) ***J. Tapadinhas,*** Spéc. de la phosph. Soc. Biol. **105,** 811 (1930). — 180) ***K. Kurata,*** Ferm. Spalt. der Diphenyl-pyrophosph. Jl. of Biochem. **14,** 25 (1931). — 181) ***E. Ochiai,*** Hydrol. von Difenchyl-pyrophosph. Bioch. Zs. **258,** 185 (1932). — 182) ***K. P. Jacobsohn, F. B. Pereira,*** Spéc. de la phosphatase. Soc. Biol. **107,** 93, 1168 (1931). S.A. — 183) ***F. B. Pereira, A. da Cruz,*** Spéc. de la phosphatase. Soc. Biol. **107,** 1170 (1931). S.A. — 184) ***T. Kitasato,*** Metaphosphatase. Bioch.-Zs. **197,** 257; **201,** 206 (1928). — 185) ***G. Quagliariello, G. Scoz,*** Esist. di una lipase nel tess. adip. Arch. di Sci. Biol. **17,** 513 (1932). S.A. — 186) ***C. Neuberg, J. Wagner, K. P. Jacobsohn,*** Asymm. Wirk. der Phosphatasen. Bioch. Zs. **188,** 227 (1927). — 187) ***A. Gualdi,*** Wirk.-Weise tier. Phosphatase. Bioch. Zs. **205,** 320 (1927).

Auch Methyl-propyl-carbinol-PhS ließ einen asymmetrischen Verlauf erkennen, ebenso wird aus d,l-2 Methylbutanol (1) nach v. FALKENHAUSEN (l. c. 169) d etwas schneller gespalten. Zusatz von Alkaloiden kann beim Bornylphosphat die Bevorzugung einer optischen Komponente umkehren (KUROYA **188)**).

Difenchyl-pyro-PhS wird aus rac. Gemisch l>d gespalten, die isolirten optischen Antipoden gleich schnell (OCHIAI **181)**).

§ 287a. 6.). **Reversion der Wirkung.** Anläßlich der großen Bedeutung, welche die Phosphorylirung, also die Veresterung mit PhS für den Zuckerabbau hat, hat früher die Frage eine gewisse Rolle gespielt, ob es eine besondere „Synthease", eine **Phosphatese** gibt (H.W. S. 518). Diese Frage ist rein experimentell auch heute noch nicht geklärt, aber die Annahme aus grundsätzlichen Erwägungen wohl nicht notwendig.

Für die einfachen Ester der PhS braucht es zur Synthese sicherlich keines anderen Enzyms, als der Phosphatase selbst. Diese Synthesen lassen sich durch Wahl passender Konzentrationen mit allen diesen Enzymen aus anorg. Phosphat und einem Überschuß des betreffenden Alkohols erzielen: mit gewöhnlichen Alkoholen, Glycerol, Glykol (MARTLAND u. ROBISON **189)**, KAY **190)** (l. c. 152)), Sorbit, Dulcit (ROCHE **191)**), und sind ganz normale Gleichgewichtsreaktionen, wie wir sie für Lipasen, Glykosidasen etc. genau kennen. Auch die Beobachtung MARTLANDS **192)**, daß bei ph < 7,3 die Spaltung, > 7,3 die Synthese begünstigt wird (Blut) bedarf zur Erklärung nicht zweier Enzyme.

Es lassen sich aber auch die normalen Zucker (Pyranosen) auf dieselbe Weise mit Phosphatase verestern, so Glucose, Mannose, Fructose (MARTLAND u. ROBISON **189)**, ROCHE **191)**), so daß auch hier von einer besonderen „Phosphatese" abgesehen werden kann. Und somit ist es unwahrscheinlich, daß ein solches Spezialenzym der Synthese beim Zuckerabbau in Hefe und Muskel intervenirt.

Bei allen Schwierigkeiten und Zweifeln, die auch heute noch das Problem begleiten, wie man die Vorgänge der „Phosphorylirung" in den Zuckerabbau einzuschalten hat, wird doch das eine immer klarer, daß überall, wo man diese Phosphorylirung erkennen kann — mit Sicherheit neben dem Muskel in Hefen und Erythrocyten — es sich nicht um eine einfache Umkehrung der phosphatatischen Spaltung handelt, nicht um einen Vorgang vergleichbar der oben erwähnten Bindung von PhS an Pyranosen, sondern um sehr verwickelte Vorgänge von Reaktionskoppelungen, bei denen einerseits die Bestandteile der „Cozymase", also in erster Linie die Adenylpyro-PhS entscheidend mitwirken, andererseits die oxydoreducirenden Fermentsysteme des Abbaues selbst. Es sei hierzu nur an die Befunde von SCHÄFFNER u. BAUER **193)**, **193a)** erinnert, daß in zellfreien, phosphatasehaltigen Hefesäften ohne das (präparativ entfernte) Redoxasen-System keine Phosphorylirung eintritt, daß man sie aber durch Hinzufügung eines fremden — an sich auch unwirksamen — Redoxasensystems (aus Orangensamen) in Gang bringen kann. Außerdem ist wahrscheinlich trotz einiger Bedenken — speciell für den Muskel, wegen zeitlicher Verschiebungen — ein Zusammenhang gegeben zwischen der Abgabe von PhS aus der Adenylpyro-PhS und der Auf-

---

188) ***M. Kuroya,*** Willkürl. beeinfl. asymm. Spaltg. Bioch. Zs. **225**, 452 (1930). — 189) ***M. Martland, R. Robison,*** Bone phosphatase. Biochem. Jl. **21**, 665 (1927). — 190) ***H. D. Kay,*** The phosphatase of mammalian tissues. I. Biochem. Jl. **22**, 855 (1928). S.A. — 191) ***J. Roche,*** Plasmaphosph. Biochem. Jl. **25**, 1724 (1931). S.A. — 192) ***M. Martland,*** Phosph. esterase of blood. Biochem. Jl. **19**, 117 (1925). S.A. — 193) ***A. Schäffner, E. Bauer,*** Zusammenhang zw. Phosphorylir. u. Oxydored. etc. Naturw. **1934**, 855. — 193a) ***A. Schäffner, E. Bauer, H. Berl,*** Hefenphosphatese. Zs. phys. Chem. **232**, 213 (1935).

nahme durch die Zucker, und sei es auch nur, woran DISCHE 194) denkt, die Aufnahme der zweiten PhS, um Diphosphat zu bilden. Wenn wir weiterhin bedenken, daß die gewöhnliche unspezifische „Phosphatase" im Muskel praktisch fehlt, und daß die Wirkungen der Aktivatoren und Hemmungskörper hier nicht einfach als Beeinflussung der Phosphatase gedeutet werden können, sondern es sich hier um Wirkungen auf die vorbedingenden Reaktionen handelt, so kommen wir zu der Annahme, daß es wahrscheinlich überhaupt keines besonderen Enzyms bedarf, um die ersten Stadien der Phosphorylirung zu erreichen. Man kann sich das vorläufig so vorstellen, daß das Enzymsystem des ersten Angriffs die sehr labilen Reaktionsformen bildet, und daß diese ganz spontan (oder in Reaktionskoppelung mit Adenylpyro-PhS) in Phosphate übergehen, um sich vorübergehend zu stabilisiren. Dieser Gedanke wird durch die neuesten Befunde MEYERHOFS (l. c. 54a) nähergebracht, daß nämlich die phosphorylirten Zuckerabbau-stoffe (Phospho-brenztraubensäure) ihrerseits die PhS auf Adenylsäure übertragen können. Geklärt ist das alles noch nicht, aber eine spezifische Synthease, eine Phosphatese, unwahrscheinlicher als je.

v. EULER 195) hat in einem kritischen Bericht nochmals das wesentliche Material über diese Zusammenhänge der eigentlichen oxydoreducierenden Prozesse des beginnenden Zuckerabbaues, des „ersten Angriffs", mit der Ausbildung und Spaltung der Phosphate, resp. mit den dabei entstehenden Gleichgewichten durchgemustert. Er kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, daß diese Prozesse eben nicht zu trennen sind; er diskutirt sogar die Möglichkeit, daß die zugehörigen Enzyme innig verkoppelt sind, etwa als verschiedene Wirkgruppen auf demselben Träger. Wir müssen also die weitere Diskussion auf das Kap. Zuckerabbau verschieben.

Zur Definitionsfrage macht EULER noch den sehr wichtigen Vorschlag, das ganze Enzymsystem, das an der Bildung der Phosphate beteiligt ist, ruhig weiter „Phosphatese" zu nennen, nachdem man sich darüber klar ist, daß ein eigenes, ganz spezielles Enzym, das nur synthetisch phosphorylirt, eine Synthease, nicht vorhanden sit. „Phosphatese" ist ein Enzymsystem, in dem neben Phosphatasen auch Enzyme oxydoreducirender Wirkung mitspielen, ohne daß die Rolle der einen oder anderen Gruppe völlig isolirt darzustellen ist.

II. Natur und Eigenschaften.

1) Darstellung, Eigenschaften, Kinetik, Einheiten.

§ 288. Von einer „Darstellung" der Enzyme im Sinne der Gewinnung hochgereinigter und hochwirksamer Präparate kann bisher nur selten gesprochen werden. Meist sind bisher überhaupt keine „Präparate", d. h. chemisch vorbehandelte Enzyme verwendet worden, sondern einfach die Organe selbst oder Trockenpulver der Organe oder Extrakte resp. Macerationssäfte etc. Zur vorläufigen Reinigung sind dann die überall üblichen Methoden angewendet worden, um stabile und vergleichbare Präparate zu erhalten, so von MARTLAND und ROBISON 196) bei Knochen: Wasserextrakt mit Alkohol-Äther gefällt, gelöst, Fällung beim isoel. Punkt, Dialyse, Ultrafiltration.

Bei Niere extrahirt ERDTMANN 197) die Trockenniere mit sehr schwachem NH_3. Dialyse schwächt die Aktivität sehr erheblich durch Wegnahme des natürlichen Aktivators (s. u.).

194) ***Z. Dische,*** Koppel. zw. Resynthese d. Adenylpyro-PhS. etc. Naturw. **1934,** 855. —
195) ***H. v. Euler,*** Z. K. der Phosphatese-Wirkg. Svensk kem. Tidskr. **47,** 16 (1935). S.A. —
196) ***M. Martland, R. Robison,*** Prepar. of bone-phosph. Biochem. Jl. **23,** 237 (1929). S.A. —
197) ***H. Erdtmann,*** Glyceroph.-Spalt. durch Nierenphosphatase. Zs. phys. Chem. **172,** 182 (1927), **177,** 211, 231 (1928). S.A.

Mit Adsorption (Tonerde aus 30 % alkoholischer Lösung) hat ERDTMANN nicht viel erreicht. Dagegen liegen eine große Reihe von Arbeiten der Schule AKAMATSU in Chiba (Japan) vor, die in den mannigfachsten Variationen Adsorptionen an Phosphatasepräparaten ausgeführt haben. Diese ergaben nicht nur gut wirksame Präparate, sondern haben nach Ansicht der Forscher sogar zu scharf charakterisirbaren verschiedenen Enzymen geführt, wie wir schon § 283 berichtet haben (s. a. die ph-Tabelle § 289): KOBAYASHI, INOUYE, ASAKAWA, sowie OHMYIA **198**)).

Um ein Beispiel zu geben: KURATA **199**) gewann aus Niere durch Adsorption mit $Mg(OH)_2$ in acetat-alkalischem Milieu im Filtrat eine reine Pyroph., aus Leber durch Adsorption mit Tonerde in essigsaurem Milieu im Filtrat reine Phosphoesterase. TAKAHASHI **200**) reine Pyroph. aus Kaninchenniere durch Autolyse, Dialyse, Ansäuern, Dialyse, Adsorption an Kaolin, Elution mit Phosphat. Blutkörper sollen keine Pyrophosphatase enthalten (KURATA). Auf diesen Wegen glauben die Autoren sowohl die „saure" wie die „alkalische" Pyroph. als eigenes Enzym rein dargestellt zu haben. Im übrigen finden sich in den Arbeiten dieser japanischen Autoren allerlei gegensätzliche Einzelheiten; es wird mit bisher unbekannten Aktivatoren etc. manipulirt, so daß eine wirkliche Klarheit über die essentielle Verschiedenheit der angegebenen Enzyme noch nicht besteht (§ 283).

Auch die Adenyl-pyrophosphatase ist von den anderen Ph. der Leber getrennt worden (§ 294); nach einer neuen Arbeit von SATOH **200a**) soll Adenyl-pyrophosphatase nicht spezifisch, sondern ein Gemisch von Mono-Esterase und Pyrophosphatase sein.

Auf die behaupteten chemischen Beziehungen zwischen einigen Phosphatasen (Hefe, *Aspergillus*, Reiskleie) und Bios, Vitamin B_1 und der Cozymase in dem Sinne, daß die Phosphatasen als solche diese Stoffe ersetzen können, kann hier nur hingewiesen werden (**205a**).

Über die Trennung der beiden Gewebsphosphatasen durch BAMANN s. u. Trennung der Ph. (Kaninchenleber) von den Amidasen durch Adsorption an $Al(OH)_3$ ($C\gamma$), wobei die Ph. in der Restlösung bleibt, SCHMIDT (l. c. 258). Weiteres über präparative und analytische Methodik s. Hauptwerk Bd. III, 743 (1929). Methodisch-analytische Einzelheiten, Phosphatasebestimmung im Blut bei BODANSKY c.s. **201**), JENNER und KAY **202**), Weiteres § 291. Methodisches über Phytophosphatasen im Malz LÜERS **203**).

Ein erfolgreicher Versuch, mit modernen Hilfsmitteln hochwertige Enzympräparate zu bekommen, ist von EHRENSVÄRD (bei EULER) **204**) wie folgt unternommen worden:

Trockenniere, Proteine partiell durch Pankreatin abgebaut. Dialyse. Wirkungssteigerung bis auf die Höhe des sehr wirksamen Knochenenzyms. Lösen in 20 %igem Aceton, zentrifugiren, mit Aceton fällen. Partielle Adsorption an Stearinsäure, Adsorptionsrestlösung mit Aceton-Äther fällen. 20 % wirksamer als bestes Knochenferment. Das Präparat EHRENSVÄRDS gab MILLON und MOLISCH, sehr stark Ninhydrin-Reaktion, schwach Biuret.

Noch weitere Reinigung und Gewinnung hochwertiger Präparate aus Niere gelang ALBERS **205**). Freilegung der Ph. mittels Autolyse in Essigester; dieser hat den Vorzug, daß sich durch freiwerdende Essigsäure automatisch ein Puffersystem mit dem ph 5—6 einstellt, so daß keine Eiweiß-Ballaststoffe in Lösung gehen. Essigester + Toluol ergibt mehr, aber weniger wirksames Enzym. Fraktionirte Fällung mit Alkohol. Bei 50 % Alkohol fällt

198) ***S. Ohmyia,*** Ferm. Hydrol. der Hexosid-PhS. Jl. of Biochem. **18,** 125 (1933). — 199) ***K. Kurata,*** Ferm. Spalt. der Diphenyl-pyro-PhS. Jl. of Biochem. **14,** 25 (1931). — 200) ***H. Takahashi,*** Pyrophosphatase. Jl. of Biochem. **16,** 447 (1932). S.A. — 200a) ***T. Satoh,*** Hydrol. der Adenosin-triphosph. etc. Jl. of Biochem. **21,** 19 (1935). S.A. — 201) ***A. Bodansky c.s.,*** Phosphatase studies. Jl. of Biol. Chem. **99,** 197, **101,** 93 (1932/3). — 202) ***H. D. Jenner, H. D. Kay,*** Plasma phosphatase III. Brit. Jl. exp. Path. **13,** 22 (1932). — 203) ***H. Lüers,*** Phytophosphatasen. Abderhaldens Hb. biol. Arb. Meth. IV 1, 779 (1930). S.A. — 204) ***G. Ehrensvärd,*** Phosphatase I. Zs. phys. Chem. **217,** 274 (1933). — 205) ***H.*** u. ***E. Albers,*** Nierenphosphatase. Zs. phys. Chem. **232,** 156, 189 (1935). S.A. — 205a) ***C. Arnaudi, M. Francioli,*** Wirk. einiger Phosphatasen etc. Bioch. Zs. **250,** 125 (1932). S.A.

nur Ballast, bei 65 % fast das gesamte Ferment. Der im Rohsaft vorhandene Hemmungskörper wird nicht mitgefällt, also Vermehrung der Aktivität. Aktivität 10—15 PE/mg. Nochmalige Fraktionirung von 58—63 % Alkohol, 40—80 PE/mg. Weitere Reinigung durch Abscheidung (Vakuum-Exsikkator) von Mg-NH_4-Phosphat: 150 PE/mg; 26 mal aktiver als das bisher beste Knochenenzym, 400fache Anreicherung gegen die Rohsäfte. Weitere Reinigungsversuche mit Bleiacetat. Gibt Eiweißreaktionen. Bei der Dialyse resp. Elektrodialyse geht ein „Stabilisator" fort (Mg?), so daß die Aktivität schnell absinkt. In der 2. Mitt. wird eine Verbesserung der Methode angegeben: es wird gleich zum Autolyse-Ansatz Alkohol hinzugegeben. Dadurch wird weniger Eiweiß aufgelöst, unwichtige Begleitstoffe aber abgebaut, Ph. nicht angegriffen. Abscheidung direkt in hochgereinigtem Zustand (40—50 PE/mg).

Freilegung und Reinigung der Ph. aus Hefe mit ph = 6 A. Schäffner (l. c. 303): Glycerolextraktion, Dialyse; dadurch Abtrennung vom Oxyd.-Reduktionssystem der Hefe. Demgegenüber ist die andere Ph. mit opt. ph von ca. 4 (l. c. 225a) ein ausgesprochenes Desmoenzym (s. u.); es bleibt bei der Autolyse im Rückstand und ist nur durch Verdauung des Rückstandes (Amylase, Trypsin, am besten Grünmalz) freizulegen.

Nachdem Bamann bei den Esterasen (§ 263) festgestellt hatte, daß sie z. T. als **Desmo-Enzyme** fest an Eiweißkörper der Zelle verankert sind und erst durch bestimmt gerichtete autolytische Zerfallsprozesse loszulösen sind, hat er **(206, 207)** nunmehr dieselben Bedingungen auch bei den Ph. gefunden. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, von vornherein reinere Enzyme zu erlangen, d. h. weniger belastet mit nicht zum System gehörigen Ballaststoffen, weiterhin verschiedenartige Enzym-Systeme je nach Art ihrer Belastung, und endlich, auf diesem Wege von vornherein die beiden von ihm aufgefundenen Ph. tierischer Organe (l. c. 213) mit ihrem verschiedenen ph-Optimum (5—6 resp. 9), partiell zu trennen.

Die „saure" Ph. läßt sich leicht bei Autolyse im natürlichen Milieu freilegen, in 24 h 90 %. (Die Lipase bleibt dabei zum überwiegenden Teile gebunden.) Dagegen ist die „alkalische" Ph. sehr fest gebunden: weder durch saure noch durch alkalische Autolyse lassen sich mehr als 40—50 % freilegen. Dadurch ist also eine gewisse Trennung der beiden Enzyme möglich. Eine volle Trennung gelingt dadurch, daß die „saure" Ph. mit n/20 NH_3, die „alkalische" mit n/20 Essigsäure zerstört werden kann **(207)**. Es liegt hier also umgekehrt wie bei der Hefe (s. o.), bei der grade die stark saure Ph. ein Desmo-Enzym ist.

Diese verschiedenen Stabilitäten der Enzyme bei verschiedenem ph haben es Bamann **207**, IV) ferner ermöglicht, auch die stets die Ph. begleitende gewöhnliche Lipase abzutrennen, da diese ebenfalls bei n- essigsaurer Lösung inaktivirt wird.

Die chemischen Eigenschaften der als rein gedachten Enzyme festzulegen, wird ebenso wie bei den Lipasen dadurch erschwert, daß im natürlichen Milieu wieder allerlei aktivirende oder hemmende Begleitstoffe vorkommen. Es ist durchaus möglich, daß die auffallenden Verschiedenheiten im opt. ph, in der Mg-Wirkung etc. zwischen den Enzymen verschiedener Herkunft wieder darauf zurückzuführen sind, daß diese Einflüsse zunächst garnicht das eigentliche Fermentsystem, sondern eben die Begleitstoffe treffen. Es kann z. B. ein falsches ph-Optimum — wie bei der Magenlipase — dadurch vorgetäuscht werden, daß bei einem an sich durchaus nicht optimalen ph ein Hemmungsstoff ausgeschaltet wird.

Eine solche ph-Verschiebung durch Salze hat Inouye **208)** bei der Taka-Ph. beobachtet

206) ***E. Bamann, E. Riedel, K. Diederichs,*** Freileg. der Phosphoesterasen aus d. Leber. Zs. phys. Chem. **230,** 175 (1935). S.A. — 207) ***E. Bamann, K. Diederichs,*** Phosphatase III, IV. Ber. Chem. Ges. **67,** 2019 (1934). S.A. **68,** 6 (1935) S.A. — 208) ***K. Inouye,*** Wirk. der Chemikal. auf Glycerophosph. Jl. of Biochem. **7,** 433, **10,** 395 (1927/8). S.A.

(durch NaF und Glycerol, von 5,56 auf 6,14 resp. 5,85); ebenso auch bei dem gereinigten Enzym (s. u.) vom opt. ph 2,8. Das liegt z. T. daran, daß eben NaF im stark sauren viel intensiver hemmt.

Ein natürlicher Aktivator, den aus der Nierenph. ERDTMANN (l. c. 197) durch Dialyse abtrennen konnte, besteht zum mindesten in der Hauptsache aus Mg (s. u.) — Einen mit Aceton zu beseitigenden Hemmungskörper in Tumoren nehmen EDLBACHER c. s. 209) an; sie vermuten, daß es Glutathion ist (§ 290). — Spontane Aktivirung von Serumph. in 24 h (Beseitigung eines Hemmungskörpers?) BODANSKY 210).

KOBAYASHI 211) und INOUYE 208) fanden bei genuiner Taka opt. ph = 5,5. Nach Adsorption opt. ph = < 4. Zugabe des Kaolin-Filtrates bringt das Optimum wieder auf 5,5. Es liegt also ein spezifischer Begleitstoff („X") vor, der die ph-Kurve beeinflußt. Es soll sich um eine Salzbildung an der basischen Gruppe des Ferment-Ampholyten handeln, da die rein anodische Kataphorese des gereinigten Enzyms (s. u.) durch Zusatz des Eluats nicht geändert wurde (212). Eine kleine Verschiebung des Minimums zwischen den beiden Optima bei Leberph. beobachtete BAMANN (l. c. 206); Dialyse des Rohenzyms verschiebt von 7 nach ca. 7,8.

Takaph. wird bei ph = 4,1 vollständig an Kaolin adsorbirt, bei ph = 5,6 vom Substrat wieder eluirt (KOBAYASHI 211)). Die Wanderung der Takaph. im elektrischen Feld ist beim Rohferment nach KOBAYASHI 212) kathodisch bis zum opt. ph (5,5), bei > 5,5 anodisch. Das gereinigte Enzym wandert jedenfalls anodisch (bis ph = 3,0), auch wenn man den Hemmungskörper wieder hinzufügt. Der wirksame Anteil des Fermentampholyten ist der nicht dissociirte Anteil. Die Affinitätskonstante (am Rohferment gemessen) ist 11,2.

Bei Knochenphosphatase deuten MARTLAND und ROBISON (l. c. 246) die ph-Kurve (Opt. = 9,4) entweder als die Dissoc. Kurve einer schwachen Säure (p_K = 8,2) oder Dissoc.-Rest-Kurve einer schwachen Base. ALBERS (l. c. 205) hält bei Nierenph. die Kurve mit Sicherheit für eine Dissociations-Rest-Kurve (Näh. und Abb. § 289).

Verhalten bei der Dialyse, Molgröße. Dieses Verhalten ist von ALBERS (l. c. 205) eingehender geprüft worden, wodurch die früheren zerstreuten Beobachtungen gesammelt und vertieft worden sind. Die Ph. der Niere passirt schnell Kollodium, aber auch eine für Saccharase undurchlässige Pergamentmembran.

Es bleibt aber immer ein kleiner undialysabler Rest, ebenso auch bei der Ultra-filtration. Die Reinigung durch Dialyse gelingt mit einer dünnen Membran aus Cellulose, die das Enzym zurückhält. Das Dialysat enthält immer noch P, Mg sehr wenig. Es ist aber dieses Verfahren praktisch ohne großen Wert, da in der zurückgehaltenen Enzymlösung eine sehr schnelle Inaktivirung eintritt, über Nacht bis zu 80 %, je konzentrirter das Enzym, um so schneller. Es geht dabei ein „Stabilisator" fort, der aus einer schwer dissociablen, wohl Mg enthaltenden Verbindung besteht. Ebendasselbe tritt bei Elektrodialyse ein. Dieses Verhalten bei der Dialyse läßt auf ein nicht zu hohes Molgewicht schließen, und in der Tat fand ALBERS mittelst Diffusionsmessungen als obere Grenzwerte für das Molat 6—10.000. Auch bei der „sauren" Hefenph. (opt. ph = 3,8) geht bei der Dialyse ein ähnlicher Stoff fort (l. c. 225a).

Kinetik der Phosphatasen. Über diese Fragen sind einzelne Angaben in vielen der im vorigen Abschnitt aufgeführten Arbeiten, so weit sie sich mit den Fermenten selbst beschäftigen, zu finden. Eine volle Erkenntnis liegt nicht vor und ist auch nicht zu erwarten, so lange über die Art und Zahl der unter dem Stichwort Phosphatasen zusammengefaßten einzelnen Enzyme noch so wenig Klarheit besteht. Bisher sind ja anscheinend fast stets Gemische verschiedener Enzymtypen untersucht worden. Außerdem ist der Einfluß der Aktivatoren und Hemmungskörper recht verwickelt und zudem

209) ***S. Edlbacher, W. Kutscher,*** Phosphatasen. Zs. phys. Chem. **207**, 1 (1932). — 210) ***A. Bodansky,*** Paradox. increase of phosph. activ. etc. Proc. Soc. Exp. Biol. **29**, 1292 (1932). — 211) ***H. Kobayashi,*** Glycerophosphatase. Jl. of Biochem. **6**, 261, **8**, 205 (1026/7). S.A. — 212) ***H. Kobayashi,*** Kataphorese der Glyceroph. Jl. of Biochem. **10**, 147 (1928). S.A.

wieder für die verschiedenen Enzymtypen verschieden. So wirkt Mg garnicht aktivirend auf die „saure" Gewebs-Phosphatase (BAMANN 213) und andererseits ist nach JACOBSEN 214) die Phosphathemmung ein komplexes Phänomen, und das erschwert wieder die Verfolgung der kinetischen Kurven, da die Wirkungsgeschwindigkeit eben sehr wesentlich durch die Phosphathemmung bedingt ist. Bekannt ist nur seit ROBISON (l. c. 189) gewesen, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung unabhängig ist von der Substratkonzentration. Nach SCHÄFFNER (l. c. 232a) verläuft die Hydrolyse von α-Glycerol-PhS durch Hefenenzym monomolekular bis zu einem ziemlich hohen Spaltungsgrad. Da im übrigen die genauere Beschreibung der Kinetik nicht zum Plane dieses Bandes gehört, vielmehr einer späteren Neubearbeitung des Allg. Teils des Hauptwerkes vorbehalten bleiben soll, sei auf die zahlreichen citirten Arbeiten von ROBISON c.s., ferner der Schule AKAMATSU, sowie auf JACOBSEN 214) verwiesen.

Hier seien nur einige Angaben von BAMANN angeführt. Er fand sowohl für die bei ph = 5 wirksame, wie für die alkalische Ph. (voll aktivirt mit $MgCl_2$) Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz im Bereiche 1 : 6.

Für den zeitlichen Verlauf der Spaltung im alkal. Gebiet (Glycerophosphat, dialysirtes Autolysat von Schweineleber), gibt BAMANN folgende Kurve, die sich ungefähr mit anderen Präparaten (Streuungen < 15 %) reproduciren läßt (Abb. 8).

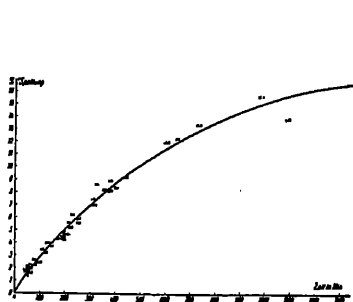



Abb. 8.
Der zeitliche Verlauf der Spaltung im alkalischen Gebiete, nach BAMANN 213).

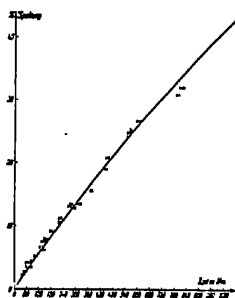



Abb. 9.
Der zeitliche Verlauf der Spaltung im alkalischen Gebiete unter Zusatz von Magnesiumchlorid, nach BAMANN 213).

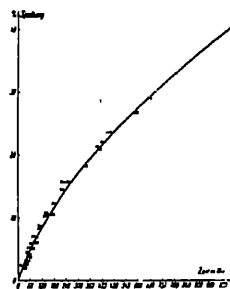



Abb. 10.
Der zeitliche Verlauf der Spaltung im sauren Gebiete, nach BAMANN 213).

Bei Zusatz von Mg werden die Verhältnisse dadurch unübersichtlich, daß Mg-Phosphat ausfällt, resp. bei NH_3-NH_4 Cl-Puffer Mg-Am-Phosphat. BAMANN verwendet also Überschuß von Mg, um auch nach Fällung noch genügend Mg zur Voll-Aktivirung zu haben. Dann ergibt sich folgende Kurve (Abb. 9).

Bei Autolysaten ist der Umsatz größer, wenn die Substratkonz. höher ist, bei dialysirten Präparaten dagegen bei 0,2 % > 1 %. Mg-Zusatz gleicht diese Anomalie aus. Wahrscheinlich enthält eben das Autolysat an sich genügend Mg, das bei der Dialyse verloren geht. Aber auch dann ist der Unterschied in der ps-Kurve zwischen Enzym und Enzym + Aktivator noch unerklärt.

Das „saure" Enzym zeigt folgende Kurve (Abb. 10). Hier liegen die Dinge viel einfacher: für die ps-Kurve gilt immer, daß der Umsatz bei 1 % Substrat größer ist als bei 0,2 %. Weder Reinheitsgrad noch Mg hat auf den absoluten Umsatz bei variirter Substratkonz. einen Einfluß.

---

213) ***E. Bamann, E. Riedel,*** Vork. zweier . . . Phosphatasen Zs. phys. Chem. **229**, 125 (1934). S.A. — 214) ***E. Jacobsen,*** Phosphathemmung der Nierenphosphatase. Bioch. Zs. **249**, 21, **267**, 89 (1932/3).

Einheiten der Phosphatasewirkung liegen noch nicht fest. Bisher hat sich fast jeder Autor für vergleichende Konzentrationsmessungen an Organen etc. irgend einer empirischen Einheit bedient, die aufzuzählen hier ohne Interesse wäre. ERDTMANN (l. c. 197) benennt nach dem bekannten Prinzip v. EULER's die Einheit Phos-f. $= \frac{10}{\text{T. g. Enzym}}$ wobei T die Zeit in h ist, in der das Präparat PhS entsprechend 30 mg Pyrophosphat freigesetzt hat.

Nach BAMANN (l. c. 213) ist es sehr schwierig, eine objektive, auch von anderen reproducirbare Phosphatase-Einheit zu fixiren, da im Gegensatz zu den Esterasen die Kinetik sehr vom Reinheitsgrad des Enzyms abhängt. Man kann deshalb — wie bei Magenlipase — nur „scheinbare Enzymmengen" bestimmen. Als solche Einheit, also je nachdem Ph-E[e]9 oder Ph-E[e]5,5 bezeichnet BAMANN diejenige Enzymmenge, die in 20 ccm Ansatz in 60 Min. 2,5 % des Glycerophosphats spaltet (nicht 25 %, wie bei Esterase-Einheit, vgl. § 264).

ALBERS (l. c. 205) definirt als Phosphatase-Einheit PE die Enzymmenge, die bei optimalen Bedingungen (ph = 9, t = 35°, Mg-Zusatz von 0,001 bis 0,006 m) in einer h aus β-Glycero-phosphat Phosphat freisetzt entspr. 0,1 mg P. Dieser Umsatz soll nicht mehr als 10 % der gesamten PhS betragen; entsprechend für Hefe (**225a**) ph = 3,8 ohne Mg.

2) Einwirkung äußerer Faktoren.

§ 289. **Beständigkeit.** Nach BAMANN (l. c. 206) sind beide Ph. tierischer Gewebe in wäss. Lös. bei neutraler Reaktion im Eisschrank recht beständig, ebenso die „alkalische" Ph. bei ph = 9. Dagegen sind beide bei ungünstigem ph unbeständig, die „saure" bei alkalischer R., die „alkalische" bei saurer R., so daß man sie, wie oben erwähnt, dadurch trennen kann. Aber auch bei schon sehr schwach alkalischer R., > 9,0 wird die Knochenphosphatase schnell inaktivirt (l. c. 246), so daß in 24 h. die Wirkung bei 9,4 schon nicht mehr größer ist als bei 8,4, und so ein scheinbares flaches Optimum sich ergab. Bei > 9,55 werden in 24 h 60 % inaktivirt. Auch die Ph. der Hefe ist sehr empfindlich gegen Alkali (l. c. 267a).

Temperaturoptimum. Angaben in fast allen Arbeiten, ziemlich übereinstimmend bei ca. 40°. Für Nierenphosphatase nach UMENO **215**) 42,5°, Zerstörung 60—65°. Malz (Pyrophosphat) Opt. 37—42°, 57° zerstört nach 45′ zu 75 % (LÜERS c. s. l. c. 229).

ALBERS (l. c. 205) fand schon bei 35° in 20 h 20% Verlust (gereinigtes Enzym). 10′ bei 50° schädigen nicht, bei 75° fast völlige Vernichtung. Halbwertszeit nach EULER bei 60° 2,3 Min.

Eine abweichende Angabe (Knochen und Organe) von TITHERINGTON **216**) (55—58° Optimum) sei nur registrirt. Die Wirkung bei niedrigen Tempp. läßt sich berechnen nach der Formel $\log K = -\frac{A}{T} + C$; hier ist A = 10.000, C = 9,05 (ROTINI **217**)).

Licht- und Röntgenstrahlen ohne Einfluß (**218, 219**). Dagegen hemmt **U.V. Licht** stark, sowohl Taka (PINCUSSEN **220**)) wie auch tierische Organfermente (HEYMANN **221**))

215) ***M. Umeno,*** Optim. Temp. der Nierenphosphatase. Bioch. Zs. **231,** 334 (1931). — 216) ***R. J. Titherington c.s.,*** Phosphatase described by ROBISON. Jl. of Biol. Chem. **78,** XVI (1928) BPh **47,** 488. — 217) ***O. T. Rotini, A. Fabris,*** Attiv. enzym. a bassa temp. III Glicerofosf. Ann. Labor. Ric. Ferm. Spallanzani **2,** 501 (1931). — 218) ***J. Horii,*** T-B-Phosphatase II. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. 2, 62 (1931) BPh **67,** 376. — 219) ***M. Morii,*** Einfl. der Röntgenstrahlen auf die Tb-Phosph. ebd. H. 2, 21, BPh **67,** 376. — 220) ***L. Pincussen, T. Oya,*** Spalt. der Lecith. durch Takadiast. Bioch. Zs. **215,** 365 (1929). S.A. — 221) ***W. Heymann,*** Wirk. von bestrahlt. Ergosterin etc. auf Gewebephosph. Bioch. Zs. **227,** 1 (1930).

und ein Enzym aus Tuberkelknoten **(218)** (Ph. im Blute selbst soll durch U.V. gefördert werden, § 291).

Optimaler ph. Wie bereits einleitend bemerkt, sind bei den Phosphatasen verschiedener Herkunft und in der Wirkung auf verschiedene Substrate gradezu erstaunliche Differenzen beobachtet worden, die von der Schule AKAMATSU als Kennzeichen ganz verschiedener Enzymgruppen sowohl im Hinblick auf die chemische Natur wie auf die Wirkungsspezifität angenommen werden. Die noch zulässige ph-Breite scheint meist recht erheblich zu sein. JACOBSEN (l. c. 159) arbeitete mit allen Phosphatasen zwischen 6,5 und 7,2. Auch BAMANN (l. c. 213) findet die alkalische Ph noch bei ph = 6 deutlich wirksam, aber nur bei Vollaktivirung durch Mg. Zum Teil scheint das an einer schnellen Inaktivirung bei ph > 9 zu liegen (l. c. 246).

I. Saure Optima.

Herkunft	Substrat	ph	Autor	Bemerkungen
Helix	Glycerol-PhS	3,0	KARRER **222)**	Hepatopankreas.
Taka	Glycerol-PhS	2,8	INOUYE **223)**	gereinigtes Präp.
„	β-Glyc.-PhS und andere Ester sekund. Alkohole	2,8	ASAKAWA **224)**	
„	Diphospho-glycerins.	2,9	KOBAYASHI **225)**	für die β-Stellung
Hefe (bes. Oberhefe)	β-Glycerol-PhS, Zymophosphat	< 4,0	ALBERS **225a)**	
Schweineniere und Reiskleie	einfache Ester	3,0	MUNEMURA **226)**	
desgl.	Pyrophosphate	4,0	MUNEMURA **226)**	
Milz	Glycerol-PhS	4,8	DAVIES **227)**	β schneller als α.
Erythrocyten	primäre Ester	4,0	HORI **228)**	
Malz	Glycerol-PhS	5,2	LÜERS **229)**	
Harn	Zymophosphat	5,0	DEMUTH **230)**	
Sojabohne	Glycerol-PhS	5,2	KAY und LEE **230a)**	
Taka	Glycerol-PhS	5,56	KOBAYASHI **225)**	Rohpräparat.
„	Glycerol-PhS	5,75	ROTINI **231)**	
„	α-Glycerol-PhS	5,5	ASAKAWA **224)**	für prim. Ester.
„	Diphenylphosphat u. ä.	5,6	UZAWA **232)**	Phospho-di-est.
„	Diphosphoglycerins.	5,5	KOBAYASHI **225)**	für die α-Stellung.
Reiskleie	Diphenylphosphat	5,6	UZAWA **232)**	
„	Pyrophosphate	5—6	UZAWA **232)**	
Reisextrakt	Glycerol-PhS	5,8	ROTINI **231)**	
Malz	Nucleotide, Sacch.-PhS	5,5	LÜERS **229)**	scharfes Maximum
Hefe	α-Glycerol-PhS	6—7	SCHÄFFNER **232 a)**	wirkt kaum auf β.
Hefe	Zymophosphat	6,5	KERTESZ **233)**	
Hefe	Pyrophosphate	6,8	LÜERS **234)**	
Erythrocyten	Glycerol-PhS	5,6	HORI **228)**	zweites Optimum.
Leber u. Niere	Glycerol-PhS	5,0—6,0	BAMANN **213)**	erstes Optimum.
Erythrocyten	verschiedene Ester	6,0—6,8	ROCHE **235), 236)**	
Malz	Saccharose-PhS	6,0	LÜERS **229)**	
Blutkörper u. a. Gewebe	Phosphoglycerinsäure	ca. 6,6	BARRENSCHEEN (l. c. 104b)	Übergang in Brenztraub.

II. Neutrale und alkalische Optima.

Herkunft	Substrat	ph	Autor	Bemerkungen
Niere	Diphenyl-PhS u. ä.	7,8	ASAKAWA 237)	Phospho-di-esterase.
Tuberk. Lymphknoten	Na-Pyrophosphat, Diäthyl-pyro-PhS	7,4—7,6	MORH 238)	
Niere u. a. Organe	Pyrophosphate	7,2—7,8	KAY 239)	
Muskel	Anorg. Pyroph.	7,0	LOHMANN 240)	
Knochen	unbek. Ester aus Blut u. a. Geweben	6,9—7,0	KING 241)	neben dem Enzym mit ph = 9
Galle	Zymophosphat	7,6	DEMUTH 230)	
Speichel	Zymophosphat	7,8	DEMUTH 230)	
Milch	Zymophosphat	7—8	DEMUTH 230)	
Knochen	Diphosphoglycerins.	7,4—7,8	BODANSKY 242)	
Darm	,,	8,2—8,6	BODANSKY 242)	
Serum Leukocyten	Phenyl-PhS u. ä.	8,5—8,6	ROCHE 235)	
Knochen, Darm und Niere	Glycerol-PhS, Hexose-monoph.	8,4—9,4	ROBISON 245)	
Leber, Darm	Nucleotide	8,7	DEUTSCH 243)	
Duodenum	Glykolester	8—9	KAY 244)	
Knochen	Glycerol-PhS Hexose-monoph.	9,4	ROBISON c. s. 246)	steiler Abfall > 9,5.
Knochen	Glycerol-PhS	9,5	ROSSI 246a)	
Milz	Glycerol-PhS	9,0	DAVIES 227)	2tes Opt.
Niere	alle Substrate	8,8—9,0	ERDTMANN 197)	dialysirt; Salze verändern nicht
Leber	Adenylpyro-PhS	8—9	BARRENSCHEEN 247)	
Niere	Glycerol-PhS	8,9—9,1	ASAKAWA 237)	
,,	,,	9,25	ALBERS 205)	
,, Reiskleie	Pyroph.	9	MUNEMURA 226)	
Niere	Lecithin	8,9	KAY 248)	
Versch. Organe	,,	8,9	KING 249)	
Milch	Glycerol-PhS	9,0	KAY 250)	
Leukocyten	biol. Substr.	8,8—9,2	ROCHE 235)	

II. Neutrale und alkalische Optima.

Herkunft	Substrat	ph	Autor	Bemerkungen
Lymphknoten, tbc.	Ortho-Ester (Glycerol, Zucker, Diaethyl-PhS)	8,8—9,2	HORII 251)	
Leber, Niere	Glycerol-PhS	9,5	BAMANN 213)	
Verschied. Gewebe	PhS-Ester, Glycerol-PhS,	8,8—9,3	KAY 252)	
Verschied. Gewebe	Zuckerphosphate	8,9	HOMMERBERG 253)	
Bakterien	verschieden	bis 10	§ 293	
Taka	Synthese von Glycerol-PhS	8,4	SUZUKI 254)	Unwahrscheinliche Angabe.

222) ***P. Karrer* c.s.**, Enzym. Spalt. der Glyc. PhS. Festschr. A. TSCHIRCH (1926) S. 421. — 223) ***K. Inouye***, ph-Abhäng. der Glycerophosphatase. Jl. of Biochem. **10**, 133 (1928). — 224) ***K. Asakawa***, Spalt. der versch. PhS-Ester. Jl. of Biochem. **11**, 143 (1930). S.A. — 225) ***H. Kobayashi***, Glycero-Phosphatase. Jl. of Biochem. **6**, 261, **8**, 205, **10**, 147 (1927/8), **11**, 173 (1929). — 225a) ***H.*** und ***E. Albers***, Hefenphosphatase. Ark. für Kemi **12 B** Nr. 3 (1935) S.A. — 226) ***S. Munemura***, Einfl. der Elektrol. auf die Phospho-monoesterase etc. Jl. of Biochem. **17**, 343 (1933). S.A. — 227) ***D. R. Davies***, Phosph. activ. of spleen extr. Biochem. Jl. **28**, 529 (1934). — 228) ***W. Hori***, Phosphomonoesterase. Jl. of Biochem. **16**, 433 (1932). — 229) ***H. Lüers, L. Malsch***, Phosphatasen im Malz. Woch. Brau. **46**, 143 (1929) S.A. — 230) ***Fr. Demuth***, Hexosephosphatasen. Bioch. Zs. **159**, 415, **166**, 162 (1925). — 230a) ***H. D. Kay, R. Lee***, Rate of hydrol. of α- and β-glyc.-phosph. Jl. of Biol. Chem. **91**, 135 (1931). — 231) ***O. T. Rotini, A. Fabris***, Glicerofosfatasi del riso etc. Ann. Labor. Ferm. Spallanzani **2**, 415 (1931). — 232) ***S. Uzawa***, Kleien-Phosphoesterase. Jl. of Biochem. **15**, 1, 11, 19, (1932). S.A. — 232a) ***A. Schäffner, E. Bauer***, Hefephosphatase. Zs. phys. Chem. **232**, 66 (1935). S.A. — 233) ***Z. J. Kertesz***, Acid. opt. of yeast hexose-di-phosphatase. Jl. Amer. Chem. Soc. **52**, 4117 (1930). — 234) ***H. Lüers, B. v. Zychlinski, K. Bengtsson***, Pyrophosphatase der Hefe. Woch. Brau. **48**, 519 (1931). — 235) ***J. Roche***, Blood-phosphatases. Biochem. Jl. **25**, 1724 (1931). S.A., Bull. Soc. Chim. Biol. **13**, 841 (1931). — 236) ***J. Roche***, Import. du substrat pour le ph-opt. . . . des phosphatases. Soc. Biol. **107**, 640, 1144 (1931). — 237) ***K. Asakawa***, Nieren-Glycerophosphatase. Jl. of Biochem. **10**, 157 (1928). S.A. — 238) ***M. Morii***, T-B-Pyrophosphatase. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. 2, BPh **66**, 637. — 239) ***H. D. Kay***, Pyrophosphatase. Biochem. Jl. **22**, 1446 (1928). S.A. — 240) ***K. Lohmann***, Chem. Natur des Cof. der Milchsäurebildg. Bioch. Zs. **237**, 445, **241**, 50, 67 (1931). — 241) ***E. J. King***, Act. of bone phosph. on the esters of phosph. acid of blood. Biochem. Jl. **26**, 1697 (1932). S.A. — 242) ***O. Bodansky, H. Bakwin***, Phosph. hydrol. of diphospho-l-glyc. acid. Jl. of Biol. Chem. **104**, 747 (1934). — 243) ***W. Deutsch***, Lebernucleotidase. Zs. phys. Chem. **171**, 264 (1927), s. a. ***W. Klein***, ebd. **207**, 125 (1932). — 244) ***H. D. Kay***, Enz. synth. of β-hydroxy-ethyl-dihydrogenphosph. Jl. of Chem. Soc. **1929**, 524. S.A. — 245) ***R. Robison* c. s.**, Phosphor. est. of cartil. Biochem. Jl. **18**, 740 (1924). — 246) ***M. Martland, R. Robison***, Bone phosphatase. Biochem. Jl. **21**, 665 (1927). S.A. — 246a) ***A. Rossi***, Fosfatasi d. ossa. Boll. Soc. Ital. Biol. **8**, H. 5, 714, S.A. — 247) ***H. K. Barrenscheen, S. Láng***, Adenosintriphosphatase. Bioch. Zs. **253**, 395 (1932). — 248) ***H. D. Kay***, Kidney phosphatase. Biochem. Jl. **20**, 791 (1926). S.A. — 249) ***E. J. King***, Enzym. hydrol. of lecith. Biochem. Jl. **25**, 799 (1931). — 250) ***W. R. Graham, H. D. Kay***, Phosph. comp. of milk. Jl. of Dairy res. **5**, 54 (1933). S.A. — 251) ***J. Horii***, Phosphatase etc. im tuberk. Knoten. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. 2, 1 (1931). BPh **67**, 375. — 252) ***H. D. Kay***, Phosphatase of mamm. tissues. Biochem. Jl. **22**, 855 (1928). S.A. — 253) ***Cl. Hommerberg***, Spez. tier. Phosphatasen. Zs. phys. Chem. **185**, 123 (1929). — 254) ***B. Suzuki, T. Maruyama***, Glyceroph. acid synth. by glycerophosphatase. Proc. Imp. Acad. Tokyo **6**, 67 (1930).

Aus diesen auf den ersten Blick verwirrenden Zahlenangaben lassen sich doch mit Sicherheit einige Tatsachen betr. verschiedene Typen von Ph. ableiten; viele andere Einzelheiten und vor Allem Deutungen bleiben allerdings strittig. Wir wollen versuchen, das Material zu ordnen. Vollständig sicher geht daraus hervor die Existenz dreier Haupttypen von Ph.

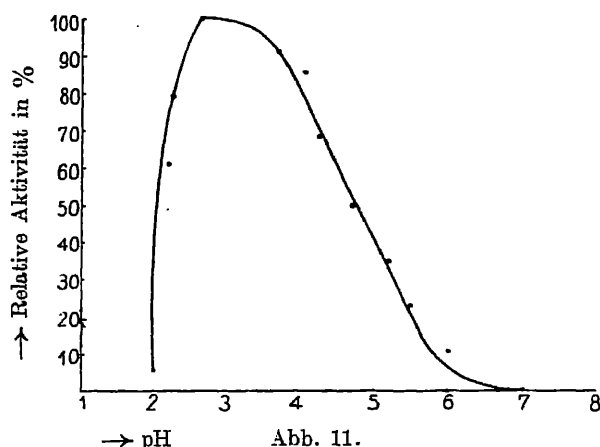



Abb. 11.
ph-Aktiv. Kurve der Takaphosphatase nach INOUYE 228).

1) eine mit extrem sauren ph-Opt. von ca. 3, repräsentirt durch die gereinigte Takaphosphatase (INOUYE 223)) (vgl. Abb.), die eine Ph. der Hefe (225a) und das Enzym von *Helix* (222).

2) die normale Gewebsphosphatase mit einem opt. ph. von ca. 9 bei der Wirkung auf einfache Ester; sie fehlt bei Hefe (232a);

3) eine ebenfalls in tierischen Geweben vorkommende Ph. mit einem opt. ph von ca. 6, die BAMANN (l. c. 213) sichergestellt hat. Nach WALDSCHMIDT-LEITZ 255) soll dies freilich kein allgemeines Gewebsferment sein, sondern ausschließlich den roten BK entstammen, aus denen oder mit denen es in die Gewebe abgegeben wird; BAMANN hält dies für unrichtig (Priv.-Mitt.). Hierzu auch die andere Ph. der Hefe (232a) und der Reiskleie (232).

Die Konstanz der ersten beiden Typen bei verschiedenen Substraten zeigt eine Tabelle von ASAKAWA 237), die aber darüber hinaus schon Angaben enthält, die wir nun näher beleuchten müssen, da sie zu den noch nicht sichergestellten Fragen überleiten.

		Ph-Optimum bei	
		Taka-Phosphatase	Nierenphosphatase
I.	β-Glycerophosphorsäure	3,1	9,0
	Isopropylphosphorsäure	„	„
	Phenäthylphosphorsäure	„	„
	Benzylphosphorsäure	„	9,4
	Phenylphosphorsäure	„	9,9
	Kresylphosphorsäure	„	„
II.	α-Glycerophosphorsäure	5,5	9,0
	Acetonglycerophosphorsäure	„	„
	Glykolphosphorsäure	„	„
	Äthylphosphorsäure	„	„
	Propylphosphorsäure	„	„
III.	Diphenylphosphorsäure	5,5	7,8
	Dikresylphosphorsäure	„	„
	Diglycerophosphorsäure	„	„
	Diäthylphosphorsäure	„	„

Es wird nämlich zunächst für die Taka von der Schule AKAMATSU (ASAKAWA 225)) angegeben, daß der opt. ph von 3 nicht allgemein gilt. Er soll vielmehr nur dann auftreten, wenn es sich um die Spaltung der PhS-Bindung an sekundäre Alkohole handelt, als deren Grundtypus die β-Glycerol-PhS anzusehen ist, oder an aromatische Hydroxyle Typus Phenyl-PhS). Bei Bindung an primäre Alkohole, also zunächst bei der α-Glycerol-PhS, tritt ein anderes ph-Opt. auf, nämlich bei 5,5 (s. Tab.).

Das soll so weit für die Differenzirung dieser beiden Enzymtypen gehen, dass man nach KOBAYASHI 256) bei solchen Stoffen, die zwei PhS-Gruppen in diesen beiden Stellungen enthalten, wie z. B. Di-phospho-glycerinsäure, beide Optima nebeneinander auffinden kann, dazwischen ein Minimum bei ph = 4. Allerdings versagt auch bei diesem ph die Wirkung nicht ganz, es werden auch hier schließlich beide PhS-Gruppen abgespalten.

Hier liegt also eine Verschiebung zwischen den beiden Formen der Glycerol-PhS vor, die wir in Form von Wirkungsverschiebungen bei verschiedenen Geweben etc. unten wiederfinden werden.

Aus der Tabelle ASAKAWA's geht aber weiterhin hervor, daß er noch eine weitere Sonderwirkung gefunden hat, nämlich bei der Spaltung von Estern, bei denen zwei Reste an PhS gebunden sind. Wir stoßen hier also wieder auf die bereits mehrfach erwähnte Phospho-di-esterase, die im einfachsten Falle z. B. auf Di-phenyl-PhS, ferner aber auch auf den Komplex Glycerol-PhS-Cholin wirken soll (§ 284). Sie soll bei Taka denselben opt. ph haben wie die Spaltung von primären Estern, bei tierischen Geweben dagegen einen wesentlich niedrigeren als bei der Spaltung gewöhnlicher Mono-Ester, nämlich 7,8. Endlich wird auch für die Spaltung von Pyrophosphaten verschiedentlich ein niedrigerer opt. ph angegeben, z. B. KAY 239).

Daß aus diesen Befunden Rückschlüsse gezogen worden sind auf eine ganze Reihe verschiedener Enzymtypen, haben wir § 283 eingehend besprochen, es erscheint mir indessen nicht gesichert, daß diese über die oben genannten bestimmt vorhandenen Typen und wahrscheinlich eine spezifische Pyro-phosphatase hinaus wirklich existiren.

Es liegen dazu noch verschiedene sonderbare Einzelangaben vor, die sich z.T. widersprechen, jedenfalls aber schwer zu erklären sind. So soll nach KOBAYASHI 256) der opt. ph von ca. 3 nur bei gereinigter Takaph. zu finden sein, während im Rohferment sich ein eigenartiger Hemmungskörper findet, der den ph nach 5,5 verschiebt, und zwar angeblich durch Bindung an das Kation des Enzyms (§ 288). Auffallend ist beim gereinigten Ferment auch der jähe Abfall auf der sauren Seite von ph = 3, Abb. 11).

Ähnliche Verhältnisse fand SCHMIDT 258) bei der Wirkung von Kaninchenleber auf Guanylsäure. Das Enzym spaltet optimal bei zwei verschiedenen ph, schwach sauer, ca. 5,5 und dem üblichen von 9. Dies gilt aber nicht für Inosinsäure, hier steigt die Wirkung gradlinig an von 5 bis 9. Es gilt auch hier nur für gereinigte Fermentlösungen: bei Rohextrakten fand auch SCHMIDT das Maximum bei ca. 4. Anscheinend liegen also auch in tierischen Geweben Hemmungskörper vor, welche den ph verschieben, so daß man auch bei tierischen Geweben, wie es die Schule AKAMATSU will, zu einem Typus mit ph = 3 gelangen kann, den BAMANN durchaus vermißt hat, der also wohl doch bei tierischen Geweben nur vorgetäuscht ist. Auch bei Bakterien sind sehr wechselnde opt. ph gefunden worden, von 5,5 bis 10 (§ 293).

Weitere Verschiebungen des opt. ph gibt ROCHE 235/6) an für die Ph. der roten BK, die auf Substrate mit 2 PhS bei einem etwas höheren ph wirken soll als auf die üblichen Substrate

255) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Nonnenbruch.*** Phosphatasen im Blut. Naturw. **1935**, 164. — 256) ***H. Kobayashi***, Ferment. Spalt. der Diphosphoglycerins. Jl. of Bioch. **11**, 173 (1929). S.A. — 258) ***G. Schmidt***, Ferment. Abbau der Guanylsäure etc. Zs. phys. Chem. **208**, 185 (1932).

(6,6—6,8 gegen 5,8—6,4,). Nach ASAKAWA **237)** soll auch eine bloße Erhöhung der Substratkonz. den ph der Gewebsph. (Niere, Knochen, Hoden) bis auf 10 steigern, was COURTOIS **260)** (l. c. 65a) für Taka und *Sinapis* bestätigt.

Was nun die eigenartigen Verschiebungen zwischen den beiden Glycerol-PhS anlangt, so ist gegenüber den positiven Angaben der AKAMATSU-Schule für Taka, denen m.W. nicht widersprochen worden ist, für tierische Gewebe noch keine Klarheit geschaffen. Nach ROCHE **235/6)** spaltet die saure Ph der BK besser α, die alkalische der Gewebe besser β; letzteres ist seit ROBISON (1924) allgemein angenommen. Für das „saure" Milzenzym findet aber DAVIES **227)** das grade Gegenteil, β wird schneller gespalten als α.

Für eine essentielle Verschiedenheit zweier Enzyme, die α und β spalten, liegen nur bei der Hefe die positiven Angaben von SCHAEFFNER **232a)** vor, daß deren eine Ph. (ph 6—7) praktisch ausschließlich α spaltet, und nur Mono-Ester, Zymophosphat träge; und von ALBERS **225a)**, daß die andere (ph ca. 4) betont β und Zymophosphat spaltet („Fructose-di-phosphatase"; vgl. § 298).

Es ist bisher noch nicht möglich, alle diese Verschiedenheiten klar zu deuten. Die Annahme, daß hier wirklich verschiedene Enzyme am Werke sind, ist die bequemste, es ist auch möglich, daß es so ist, aber erwiesen scheint es mir nicht, auch nicht, wenn man die „Verschiedenheit" dahin auffassen will, daß verschiedene Dissociationsformen der gleichen Enzyme vorliegen. Man kann doch vielleicht die Verschiebungen von der Substratseite her deuten, wie dies z.B. COURTOIS **260)** versucht. Er meint, daß man die verschiedene Spaltung der beiden Glycerol-PhS als Wirkung eines Enzyms auffassen kann, wenn man annimmt, daß wie bei der Konfigurationsspezifität entgegengesetzte Änderungen von Affinität und Spaltungsgeschwindigkeit für beide Isomeren vorliegen, die absolut genommen beide bei β größer sind. Der opt. ph ändert sich nämlich mit der Konz. des Substrates (s. o.), und die Kurven zeigen, daß tatsächlich die beiden genannten Größen nicht nur (wie immer) von der Substratkonz., sondern auch indirekt vom ph abhängen, der eben von dieser beeinflußt wird. Wenn dieser Einfluß bei α- und β-Glycerol-PhS gleich groß ist, so werden sie bei verschiedenem ph gleichmässig gespalten, so bei Ph. aus *Sinapis* (l.c. 65a); hier ist der opt. ph bei m/100 = 3,7, für m/10 = 5,8, für α wie für β.

Physikochemisch aufgefaßt ist es eben noch nicht sicher, inwieweit die Verschiebungen von der Dissoziation der Enzyme als Ampholyte abhängen, wie weit von den Eigenschaften der Substrate an sich, also etwa der Dissoc. der Ester. ASAKAWA hält es schon für möglich, beide Momente mit einander zu kombiniren und daraus Folgerungen über Affinitäten etc. abzuleiten, durch die er die Verschiebungen zwischen den beiden

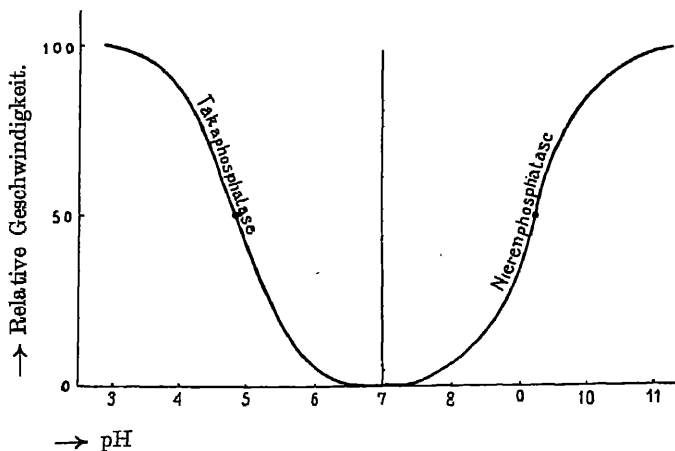



Abb. 12.
Dissoc.-Kurven von Taka- und Nierenphosphatase, nach ASAKAWA **259)**.

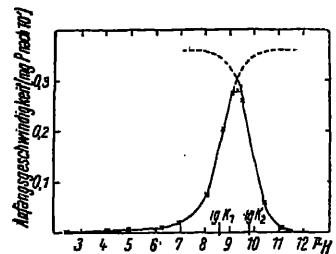



Abb. 13.
Aktivitäts-ph-Kurve der Nierenphosphatase, nach ALBERS (l. c. 205).

260) ***J. Courtois***, Hydrol. des ac. α- et β-glycérophosph. par la taka-diast. C. R. **199**, 95 (1934).

Glycerol-PhS-en und den Di-Estern klären zu können glaubt. Wir können darauf hier nur hin weisen. Er geht davon aus, daß bei β undissoc. Enzym, mit dem Ester in der ersten Dissoc.-Stufe reagirt, bei α mit der zweiten; die Kinetik der Spaltung der Di-Ester soll wieder indirekt durch die der darin enthaltenen Mono-Ester bedingt sein.

Sehr eigenartig sind die Verhältnisse der berechneten Diss. Konst. für die beiden am extremsten gelagerten Typen, Niere und Taka. Nach ASAKAWA **259)** liegen die beiden Diss.-Kurven gegen den Neutralpunkt ph = 7 symmetrisch und ergeben denselben Wert pk von 4,8. Dies aber gilt für entgegengesetzte Dissociation, Taka kationisch, Niere anionisch. Es ist also pk_a bei Taka und pk_b bei Niere gleich groß = 4,8. (Abb. 12).

ALBERS (l.c. 205) deutet seine ph-Aktiv. Kurve (Niere) (Abbild. 13) anders. Die Kurve ist durch Überschneidung zweier Kurven entstanden. Die zugehörigen Diss. Konst. sind $2{,}5 \times 10^{-9}$ und $0{,}18 \times 10^{-9}$. Sie sind entweder dem Ferment an sich oder einer Ferment-Substratverbindung zuzuschreiben. Jedenfalls ist es die Dissoziationsr e s tkurve eines Ampholyten, es sind also die nicht dissoziirten Moleküle maximal wirksam.

Ohne Entscheidungen über diese Frage vorzugreifen, ist es vorläufig andererseits nicht unzweckmäßig — genau wie man das bei den ebenfalls solche Verschiedenheiten aufweisenden Lipasen getan hat —, rein deskriptiv einige dieser Typen zu unterscheiden. Ich gebe deshalb hier eine Zusammenstellung nach MUNEMURA (l.c. 226), der folgende Gruppen unterscheidet, von dem zweifelhaften Specialfall der Phospho-di-esterasen abgesehen:

A. Phosphomonoesterase

Typus I	ph-Opt. 3	Schweineniere, Reiskleie
„ II	ph-Opt. 5,6	Erythrocyten, Reiskleie
„ III	ph-Opt. 9	Schweineniere, Reiskleie

B. Pyrophosphatasen

Typus I	ph-Opt. 4	Schweineniere Reiskleie
„ II	ph-Opt. 5—6	Reiskleie (bei Tieren noch nicht gefunden)
„ III	ph-Opt. 9	Schweineniere, Reiskleie

Die Vorkommen sind natürlich nur als Beispiele gewählt, mit denen MUNEMURA grade gearbeitet hat. Die einzelnen Gruppen sind verschieden verteilt und sollen auch gegen chemische Stoffe verschieden reagiren, s.u. Es muß wiederholt werden, daß nach BAMANN Typus I in tierischen Geweben nicht existirt, und auch bei Taka nicht ein besonderer Typus ist, sondern nur vom Substrat (β-Ester) abhängt. Das Schema kann also n u r zur vorläufigen Orientirung dienen.

Zur Übersicht seien hier die Tabellen von ROCHE (l. c. 235) betr. die ph-Aktiv.-Kurven der beiden wichtigsten Enzymtypen für verschiedene Substrate wiedergegeben:

p_H-Optima der Blutphosphatasen bei verschiedenen Substraten (nach Roche).

	Phosphatase of		
Substrate	Red corpuscles	White cells	Serum
Sodium glycerophosphate	6·0–6·2	8·6–9·0	8·6–9·0
Sodium glucosemonophosphate	5·9–6·1	9·0–9·2	8·8–9·2
Sodium fructosemonophosphate	6·2–6·3	—	—
Sodium monophenylphosphate	5·8–6·0	8·4–8·6	8·4–8·6
Sodium adenylate	6·4–6·5	—	—
Sodium guanylate	6·4–6·5	—	—
Sodium diphosphoglycerate	6·6–6·8	8·8–9·2	8·8–9·2
Sodium fructosediphosphate	6·4–6·7	8·8–9·2	8·8–9·2
Blood-phosphoric esters	6·7–6·8	—	—

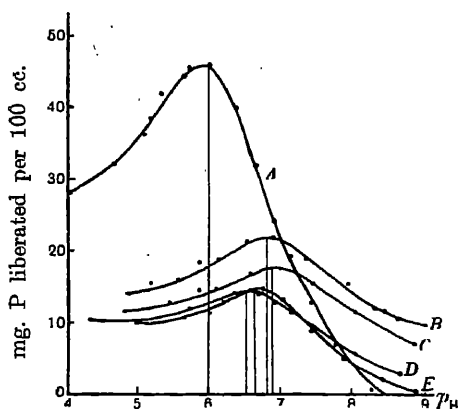



Abb. 14.

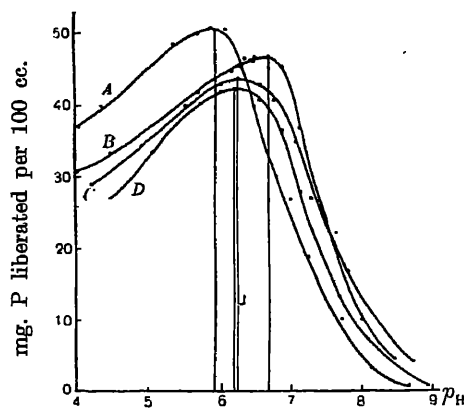



Abb. 15.

Abb. 14. p_H-activity curve for the phosphatase of the red cells. Substrates: *A*, glycerophosphate. *B*, blood-esters. *C*, diphosphoglycerate. *D*, adenylate. *E*, guanylate.

Abb. 15. p_H-activity curve for the phosphatase of the red cells. Substrates: *A*, phenylphosphate. *B*, fructosediphosphate. *C*, fructosemonophosphate. *D*, glucosemonophosphate.

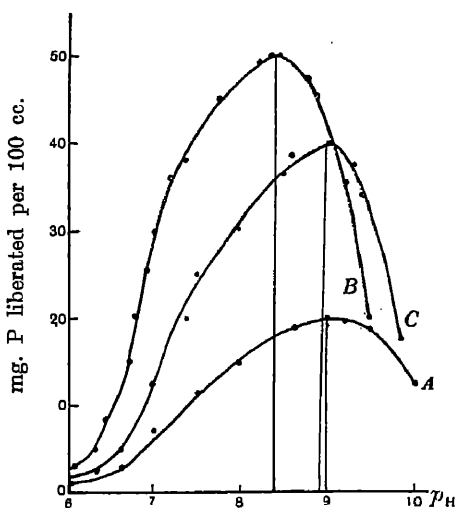



Abb. 16.

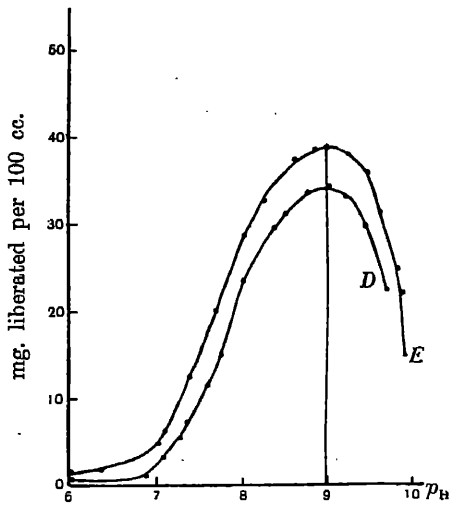



Abb. 16. p_H-activity curves for the phosphatase of the serum. Substrates: *A*, diphosphoglycerate. *B*, phenylphosphate. *C*, glycerophosphate. *D*, glucosemonophosphate. *E*, fructosediphosphate.

§ 289a. Aktivirung und Hemmung: Salze. Die gewöhnlichen Elektrolyte sind nach ODA 261) und INOUYE 262) ohne Einfluß. Auch HCN ist wirkungslos (auch SCHMIDT 258)). Die ph-Kurve wird nicht geändert (ERDTMANN l. c. 197).

Dagegen sollen nach Angaben japanischer Forscher (z.B. INOUYE 262)) MUNEMURA (l. c. 226). Sulfate und Oxalate hemmen, was auch schon DEMUTH (l. c. 230) und ERDTMANN (l. c. 197) angegeben hatten; nach MUNEMURA besonders Typus I und III, auch der Pyroph. Diese Angaben sind auffallend, weil man eigentlich F ö r d e r u n g durch Verminderung der

261) ***Y. Oda,*** Einfl. versch. Salze auf Hexosephosphatase etc. Jl. of Biochem. **8**, 45 (1927). — 262) ***K. Inouye,*** Wirk. der Elektrol. auf Glycerophosphatasen. Jl. of Biochem. **10**, 395 (1929). S.A.

hemmenden Ca-Ionen erwarten sollte; vielleicht liegen hier aber echte Affinitäten das Anions zum Enzym vor, so daß diese Anionen analog den Phosphaten specifisch hemmen könnten; vielleicht liegt eine Wesensverwandtschaft mit den Sulfatasen vor. Im übrigen hemmen Sulfate nach ERDTMANN nur bei größeren Mengen, nach INOUYE 262) wesentlich nur bei ph < 5, ähnlich Oxalate; die Hemmung hat mit einer etwaigen Kalkentziehung nichts zu tun. Oxalate hemmen nach BELFANTI (l. c. 13a) die saure Ph. aller Organe, soweit sie vorhanden ist. Die Hemming ist reversibel; sie kann durch Ausschaltung der Oxalsäure durch Dialyse oder Fällung mit Ca-Ionen wieder aufgehoben werden. Die alkalische Ph. verhält sich verschieden: die aus Knochen und Blutserum wird teilweise gehemmt, die aus Leber und Niere nicht.

Die **Phosphate** hemmen nach Übereinstimmung aller Autoren (MARTLAND u. ROBISON **263)**, HOMMERBERG l. c. 253 u. v. a.) specifisch; auch die Pyrophosphatspaltung im Muskel (LOHMANN l. c. 240), Pyrophosphatspaltung in Malz (LÜERS l. c. 229); bei Hefe war keine Hemmung nachweisbar, weil durch den großen Phosphatgehalt das Enzym bereits gehemmt war (l. c. 234).

Man deutet diese Hemmung als die allgemein bei allen F. beobachtete spezifische Affinitätsablenkung durch die Spaltprodukte, indem die Phosphate eine messbare Affinität zum Enzym aufweisen.

JACOBSEN **264)** hat die Phosphathemmung kinetisch untersucht. Sie besteht aus zwei Faktoren, einer substratunabhängigen absoluten Hemmung und einer relativen, die abhängig ist vom Verhältnis Substrat/Anorg. Phosphat. Mit abnehmender h nimmt die absolute Hemmung ab, die relative zu. Es wird für die Spaltungsgeschwindigkeit bei Gegenwart von Phosphat eine Formel entwickelt.

Besonders starke Hemmung üben **Borate** aus, was bei Boratpuffern zu beachten ist (HOMMERBERG, ERDTMANN u. a.). Bei stärkeren Borat-Konzz. sinkt nämlich die Reaktionskonstante sehr schnell ab, in 24 h auf 20 % (ERDTMANN l. c. 197).

Arsenate. Die Wirkung der Arsenate ist je nach der Art der Phosphatase im natürlichen Milieu ganz verschieden. Auf die Beziehungen zwischen PhS-abspaltung und Zuckerabbau in Hefe und Muskel, in bezug auf die Arsenatwirkung, gehen wir hier nicht ein, da sie ebenso verwickelt sind wie die Fluorid- und Jodessigsäurewirkung; hier sei nur das Material über die unspezifischen Ph. gegeben.

Während sie Taka aktiviren, hemmen sie Niere (NEUBERG **265)**; schwache Hemmung auch ERDTMANN. Aktivirung von Taka bestätigt MORII (20—25 %, ph 8,3) **266)**. Die Phosphatase aus gewaschener Trockenhefe wird nur aktivirt (Hexose-PhS), wenn gleichzeitig Gärung erfolgt, sonst nicht. Fluorid und Jodessigsäure hemmen diese Aktivirung (MACFARLANE **267)**).

Nach HOMMERBERG **(267a)** wird dementspr. Ph. im Hefen-autolysat nicht beeinflußt. Die Spaltung von Nucleotiden durch Ph. aus Darm wird so vollständig gehemmt, daß nur noch die „Nucleinase" wirksam bleibt. Wenn man unter Arsenhemmung Darmschleimhaut auf Thymo-nucleinsäure wirken lässt, bleiben die Nucleotide unverändert und können so isolirt werden (KLEIN, l. c. 37b).

Nach MUNEMURA (l. c. 226) werden sämtliche Typen gehemmt außer Pyrophosphatase III. Nach HORII (l. c. 256) wirken Arsenate und As-Präparate ganz verschieden je nach Art des Substrates, bald aktivirend, bald fördernd, die einzelnen Präparate wieder nicht gleichsinnig. Nach YAMANE (l. c. 275) wird Knochenph. durch Arsenate bei allen Substraten gehemmt, dafür findet er wieder die Wirkung der Arsenite nach dem Substrat wechselnd. — Bakterienph. kann

263) ***M. Martland, R. Robison,*** Bone-Phosphatase, Biochem. Jl. **21,** 665 (1927). S.A. — 264) ***E. Jacobsen,*** Phosphathemm. der Nieren-Phosphatase. Bioch. Zs. **249,** 21, **267,** 89 (1932/3). — 265) ***C. Neuberg, J. Leibowitz,*** Arsenaktivir. u. Spez. von Phosphatase. Bioch. Zs. **191,** 460. — 266) ***M. Morii,*** Einfl. von Arsenat auf Phosphatase. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto, C. H. 2, 23 (1931) BPh **67,** 377. — 267) ***M. G. Macfarlane,*** Act. of arsenate on hexosephosphatase. Biochem. Jl. **24,** 1051 (1930), **25,** 822 (1931). — 267a) ***Cl. Hommerberg,*** Phosphatase der Hefe. Svensk kem. Tidskr. **47,** 63 (1935), Ch. Cbl. **1935,** I, 2996.

Abgeschlossen: 20. Juni 1935. Ber. Phys. 85, H. 3/4.

aktivirt werden (280), ebenso Hefe und andere Ph., jedoch soll die Beschleunigung der PhS-Abspaltung sich eher auf die abbauenden Umwandlungen des organischen Teiles der Ester richten, als direkt auf die Phosphatase (280a). Arsinsäure, Selenite fast ohne Einfluss (l. c. 303a).

Halogene. Die charakteristische Hemmungswirkung der **Jodessigsäure** sollte sich nach LUNDSGAARD speziell auf die Phosphatese erstrecken. Es ist aber sehr unwahrscheinlich, daß eine spezifische „Synthease" bei der Anlagerung von PhS an die Zucker überhaupt existirt (§ 287a), so daß man damit die hemmende Wirkung auf den Zuckerabbau nicht deuten kann. Auch auf die Abspaltung von PhS durch die üblichen Phosphatasen sind die Halogen-Essigsäuren ohne wesentlichen Einfluß.

Bei der Wirkung von Hefenph. auf Zymophosphat fand YAMASAKI 268) keine Hemmung des Enzyms; nur die Arsenataktivirung erwies sich als abgeschwächt; ebenso MACFARLANE (l. c. 267). SCHÄFFNER (l. c. 303) fand eine leichte Hemmung bei Hefe, keine bei Niere, ebensowenig LOHMANN 269) (Niere, Glycerol-PhS) und BARRENSCHEEN (l. c. 104b) (Phosphoglycerinsäure). Die Sache hat sich nach MEYERHOF 270) dahin aufgeklärt, daß die spezifische Hemmung des Zuckerabbaus tatsächlich nicht bei irgend einer Phosphatase-Wirkung ansetzt. Die Hemmung erfolgt vielmehr in den Stadien der Prozesse, die nach der Aufspaltung der C_6-Kette in 2 C_3-Körper bei deren weiteren Umlagerungen bis zur letzten noch P-haltigen Stufe Phospho-brenztraubensäure einhergehen; wir haben uns an dieser Stelle nicht weiter damit zu beschäftigen.

Dagegen scheint die ebenso ausgesprochene Hemmung der Vorgänge im Muskel und Hefe durch **Fluoride** sich auf die Phosphatasen zu richten, oder vorsichtiger gesagt, auf die Prozesse, die mit der endgiltigen Dephosphorylirung einhergehen, die sich ja wohl nicht als ganz einfache hydrolytische Loslösung von PhS sicherstellen lassen, wenigstens beim Muskel nicht, wo sie mit der Bildung der Kreatin-PhS gekuppelt sind. Jedenfalls hemmen Fluoride diesen Teil der Abbauprozesse (MEYERHOF und LOHMANN 271), LIPMANN 272)) im Muskel und bei der alkoholischen Gärung (MEYERHOF und KIESSLING 270)). Aber auch hier wie überall im Zuckerabbau treten immer wieder Zweifel auf. Nach den letzten Befunden von LOHMANN und MEYERHOF 273) scheint NaF letzten Endes nicht die PhS-Abspaltung aus der Phosphobrenztraubensäure, sondern deren Bildung aus Phosphoglycerinsäure (§ 283) zu hemmen.

Auch die Fluorwirkung auf die unspezifischen Phosphatasen ist unklar. Während KAY (l. c. 252) und HORII 274) stets Hemmung fanden (Tbc-Knoten, Niere) gibt YAMANE 275) (Knochen) an, daß F′ der hemmenden Wirkung des Ca gegenüber fördert, indem sich CaF_2 bildet.

Nach BELFANTI c.s. (l.c. 13a) hemmt Fluorid die saure Ph.; wegen des ständigen Fluorgehaltes der Knochen soll diese dort bis zur fast völligen Unwirksamkeit gehemmt sein. Diese Hemmung ist eine langsame Zerstörung des Enzyms, die bei 37° beschleunigt wird.

ROSSI (l. c. 246) bestätigt auch für Knochen Hemmung bis zu sehr kleinen Konzz. LIPMANN 272) fand Taka wenig empfindlich; nach ASAKAWA 276) und INOUYE 277) hemmt

268) ***J. Yamasaki***, Über d. Wirkg. von monojodessigs. Natr. auf die Teilfermente der Zymase. Bioch. Zs. **228**, 123 (1930). — 269) ***K. Lohmann***, Verh. der Phosphatase in Ggw. von Glutathion u. Mono-Jod-essigs. Bioch. Zs. **262**, 157 (1933). S.A. — 270) ***O. Meyerhof, W. Kiessling***, Die phosphor. Zwischenprod. etc. der alkoh. Gärung. Bioch. Zs. **267**, 313 (1934). — 271) ***O. Meyerhof***, Enzymat. Milchsäurebildg. im Muskelextr. II u. III. Bioch. Zs. **178**, 462 (1926), **183**, 176 (1927); ***O. Meyerhof, K. Lohmann***, dass. IV. Ebenda **185**, 113 (1927). — 272) ***F. Lipmann***, Mechan. der Fluoridwirkg. Bioch. Zs. **196**, 3 (1928). — 273) ***K. Lohmann, O. Meyerhof***, Enzym. Umw. von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubens. Bioch. Zs. **273**, 60 (1934). S.A. — 274) ***J. Horii***, Phosphatase etc. im tuberk. Knoten. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. 2, 1, 62 (1931), BPh **67**, 376. — 275) ***T. Yamane***, Ortho- und Pyrophosphatase des Knochens etc.. ebd. C. **3**, 35 (1932), BPh **72**, 726. — 276) ***K. Asakawa***, Nieren-Glycerophosph. Jl. of Biochem. **10**, 157 (1928). — 277) ***K. Inouye***, Wirkg. der Chemik. auf Glyc.-Phosphatase. Jl. of Biochem. **7**, 433 (1927), **10**, 395 (1929).

aber NaF (Glycerol-PhS) bis zu 0,00625 m herunter, dabei wird das ph-Opt. (Rohenzym) nach 6,14 verschoben; bei gereinigtem Enzym (ph = 2,8) wirken schon 0,00125 m deutlich hemmend, und zwar am stärksten bei ph = 4,0. Bei Niere (Glyceroph., Diphosphoglycerinsäure) fand LIPMANN schwache, AUHAGEN **278)**, ebenso wie ASAKAWA **276)** keinerlei Hemmung, während bei Hefe starke Hemmung erfolgt; SCHMIDT (l. c. 258) fand die Spaltung von Guanylsäure durch N/200 NaF völlig gehemmt, während wieder EDLBACHER **279)** bei Nucleotidase aus Tumoren eine geringe Hemmung fand. Und endlich gibt MUNEMURA (l. c. 226) an, daß NaF alle Phosphatasen Typ I u. II hemmt, III so gut wie garnicht.

Bakterienphosphatase wird gehemmt (PETT und WYNNE **280)**) aber nur für Glycerol-PhS und Pyrophosphat, nicht Zymophosphat; die Förderung durch Arsenat wird durch Komplexbildung vermindert (**280a**).

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß YAMANE insofern Recht hat, als der unkontrollirte Gehalt der Reaktionsflüssigkeiten an Ca die Fluorwirkung verändern oder ganz aufheben kann. Molybdat soll nach MUNEMURA ähnlich wirken wie Fluorid. H_2S hemmt Nierenph. irreversibel (ALBERS l. c. 205). — H_2O_2 fast unwirksam. — KCN leichte Hemmung (l. c. 303a).

Kationen. Eine ganz besondere Rolle als Aktivator der Phosphatase-wirkung spielt das **Magnesium-Ion**, jedoch sind die Zusammenhänge noch nicht vollständig erhellt. Zwei Dinge stehen fest:

Magnesium aktivirt in gewissen Grenzen die meisten einfachen unspezifischen Phosphatasen; eine völlige Inaktivirung ist aber durch Entfernen des Mg nicht zu erzielen.

Magnesium ist unentbehrlich bei allen Prozessen des Zuckerabbaues, die mit der Phosphorylirung der Zucker und der endgiltigen Wiederabspaltung zusammenhängen, insofern als Mg ein maßgeblicher Bestandteil des Cozymase-Systems ist.

Es ist aber durchaus noch nicht sicher, ob und inwieweit man diese beiden Grundwirkungen des Mg in Zusammenhang bringen darf, resp. ob sie nicht beide unabhängig von einander auf der noch nicht scharf definirbaren biologischen Grundwirkung des Mg beruhen. Die Wirkungen der Cozymase sind sehr komplizirt und noch nicht in allen Phasen gedeutet. Jedenfalls ist die frühere Vorstellung, daß Mg gradezu als Aktivator des die Phosphorylirung katalysirenden Enzyms Phosphatese anzusehen ist, viel zu primitiv und von den Autoren aufgegeben (v. EULER c.s. **281)**) (vgl. § 287a).

Ein besonderes Enzym Phosphatese existirt wahrscheinlich nicht, und die Reversion der PhS-Abspaltung durch einfache Phosphatase ist grade im Muskel unwahrscheinlich, da dieses Enzym im Muskel kaum vorhanden ist. Welches Enzym und welcher Aktivator schließlich die endgiltige Dephosphorylirung — an der Phosphoglycerinsäure oder Phosphobrenztraubensäure — bewirken, ist noch nicht sichergestellt; das Mg scheint aber seine Hauptrolle in den Prozessen zu spielen, bei denen die Hexosen PhS aufnehmen (v. EULER c. s. **282)**); in welcher Weise, ist aber noch nicht scharf zu präzisiren.

Wahrscheinlich hängt diese Wirkung doch mit der inzwischen sicher herausgearbeiteten Phase zusammen, in welcher nach LOHMANN (§ 284) die Adenylpyrophosphorsäure als Hauptbestandteil der Cozymase aufgebaut wird aus Adenylsäure und der aus Kreatin-PhS

---

278) ***E. Auhagen, St. Grzycki,*** Einfl. von Fluorid auf die Phosphatasewirkg. Bioch. Zs. **265,** 217 (1933). S.A. — 279) ***S. Edlbacher, W. Kutscher,*** Stoffw. der Tumoren. Zs. phys. Chem. **199,** 200, **207,** 1 (1931/2). — 280) ***L. B. Pett, A. M. Wynne,*** Bacterial phosphatases. Biochem. Jl. **27,** 1660 (1933). — 280a) ***Dies.,*** Infl. of arsen. etc. on the enz. hydrol. of phosph. esters. ebd. **28,** 365 (1934). — 281) ***H. v. Euler, K. Myrbäck, R. Nilsson,*** Gärung, Phosphorylirung etc. Svensk. Kem. Tidkr. **38,** 353 (1926). — 282) ***H. v. Euler, R. Nilsson, E. Auhagen,*** Über d. Funkt. des Magnesiums beim enzymat. Kohlehydratabbau. Zs. phys. Chem. **200,** 1 (1931), Ark. Kemi B. **10,** Nr. 14 (1931).

abgespaltenen PhS in einer gekoppelten Reaktion, und dann wieder unter Freigabe der PhS in Adenylsäure zerfällt. Wenn hier auch zeitliche Differenzen dagegen sprechen, daß diese PhS sozusagen in statu nascendi direkt an alloiomorphe Hexosen gebunden wird — die Zerlegung der Adenylpyro-PhS liegt erheblich früher als die Phosphorylirung —, so mögen hier doch irgend welche Zusammenhänge bestehen, bei deren Durchführung das Mg unentbehrlich ist. In welcher Weise, ist noch nicht klar zu durchschauen; im übrigen kann das Alles erst im Zusammenhang im Kap. Zuckerabbau besprochen werden. Hier mag die Feststellung LOHMANN's **283)** genügen, daß die Phosphorylirung der Zucker nicht durch Mg allein, sondern nur durch das Zusammenwirken beider Anteile der Cozymase, also Mg + Adenylpyro-PhS durchgeführt wird.

Die Verhältnisse bei der rein enzymtypischen Betrachtung der PhS-Abspaltung im Muskel liegen an sich schon reichlich komplizirt. Auf die Aufspaltung der Adenyl-pyro-PhS (die durch ein eigenes Enzym katalysirt wird) ist Mg nach LOHMANN **283)** ohne jeden Einfluß (in Leberextrakt sogar etwas Hemmung, BARRENSCHEEN **284)**), während Muskelextrakt anorgan. Pyrophosphate ohne Mg überhaupt nicht angreift. — Auf Zymophosphat wirkt dialysirter Muskelextrakt ohne Mg nicht ein; mit Mg wird aber nur eine PhS abgespalten, es entsteht — über den NEUBERG-Ester durch Umlagerung — der EMBDEN-Ester, der nun auch bei Anwesenheit von Mg resistent ist. Eine „gewöhnliche" Phosphatase, die durch Mg aktivirt wird, fehlt hier also. Erst Zusatz von Adenylpyro-PhS führt dann den Abbau weiter, aber, wie mehrfach ausgeführt, nicht durch direkte PhS-Abspaltung, sondern zur Phosphoglycerinsäure etc.; auch in dieser Phase, für den Übergang von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure, ist wieder Mg + Cozymase unentbehrlich (§ 286).

Bei Hefe liegen die Verhältnisse ähnlich, auch hier ist die Zerlegung der Zuckerphosphate, besonders des Zymophosphates, abhängig von der „Cozymase", also z.T. auch vom Mg; RAYMOND **284a)** wies darauf hin, daß das abgespaltene Phosphat bei allen Estern, besonders aber dem Diphosphat, abnimmt, wenn man die Cozymase auswäscht.

Mg-Aktivirung der einfachen Phosphatasen. Auch hier sind noch nicht alle Zweifel beseitigt, die einzelnen Enzymtypen scheinen sich verschieden zu verhalten, sobald sie verschiedene Systeme besitzen.

Übereinstimmend wird zunächst angegeben, daß die eigentliche Gewebeph. mit dem opt. ph von ca. 9 stark aktivirbar ist, so bei Niere (ERDTMANN **285)**), Leber, Darm, Plasma (KAY **287)**), aber auch Hefe (KEESER **286)**), HOMMERBERG (l. c. 267a) und Erythrozyten (JENNER und KAY **288)**); diese freilich wechselnd, Kaninchen und Rind wenig, Ratte und Hund bis 20-fach.

Im Gegensatz zu dieser alkalischen Gewebsph. ist die saure Ph. der tierischen Gewebe nach BAMANN (l. c. 213) durch Mg nicht aktivirbar; est ist dies ein gewichtiges Unterscheidungsmerkmal dieser beiden Gruppen tierischer Ph. (l. c. 207).

Wie diese zweifellosen Ergebnisse mit den Befunden einer Aktivirbarkeit der Ph. der roten BK. **288)** zu vereinen sind angesichts der Angabe von WALDSCHMIDT-LEITZ (l.c. 255), daß die saure Ph. der Gewebe allein von den roten BK. gebildet und mit diesen in die Gewebe abgegeben wird, ist noch nicht klar. BAMANN (Priv.-Mitt.) hält diese Ansicht von WALDSCHMIDT-LEITZ für unrichtig. BAMANN weist noch darauf hin, daß bei Leberph. unter starker Mg-Aktivierung bei ph = 6 eine Rest-Wirkung der alkal. Ph. nachweisbar ist, die man also leicht

283) ***K. Lohmann***, Phosphoryl. und Dephosphoryl. Bioch. Zs. **262,** 137 (1933). S.A. — 284) ***H. K. Barrenscheen, S. Láng***, Adenosintriphosphatase. Bioch. Zs. **253,** 395 (1932). — 284a) ***A. L. Raymond***, Cozymase, its rel. to phosphatase activ. Jl. of Biol. Chem. **79,** 637 (1928) S.A. — 285) ***H. Erdtmann***, Nierenphosphatase. Zs. phys. Chem. **177,** 211, 231 (1928). — 286) ***E. Keeser***, Einfluß von Mg- und $CaCl_2$ auf einige Ferm. Arch. für exp. Path. **160,** 663 (1931). S.A. — 287) ***H. D. Kay c. s.***, Plasma phosphatase. Jl. of Biol. Chem. **89,** 235 (1930). S.A. 288) ***H. D. Jenner, H. D. Kay***, Magnesium and the phosph. system. Jl. of Biol. Chem. **93,** 733. (1932). S.A.

mit einer Aktivirung der sauren Ph. verwechseln kann, wenn beide im Gemisch vorhanden sind. Die bei ph = 4 wirksame Ph. aus Hefe wird durch Mg gehemmt (ALBERS l. c. 225a). Andererseits fand aber MUNEMURA (l. c. 226) bei der Phospho-esterase aus Reiskleie mit ihrem sauren Optimum ebenfalls eine Aktivirung durch Mg.

BAMANN weist dementspr. darauf hin, daß man nun nicht einfach sagen kann, daß alle Ph. mit saurem Optimum gegen Mg unempfindlich sind, sondern daß man in jedem Fall je nach dem Enzymsystem die Verhältnisse neu prüfen muß. MUNEMURA geht im Sinne der Klassifikation der AKAMATSUschen Schule bereits so weit, die Mg-Aktiv. ebenfalls zu rubriziren, indem sich seine verschiedenen Typen verschieden verhalten. Mg aktivirt nach seinem Schema (§ 289) nur A II, III, hemmt B III, ist ohne Einfluß auf A I, B I, II. Dagegen ist nach LOHMANN (l. c. 240) Mg unentbehrlich für die Wirkung der Pyrophosphatasen und besonders für die Spaltung von anorg. Pyrophosphat; es ist aber ohne Bedeutung für die Wirkung von Adenyl-pyroph., die nun wieder nach SATOH **288a)** (§ 294) die gewöhnliche Pyroph. enthalten soll. Hier liegen also noch verschiedene Unstimmigkeiten vor.

Ein Teil davon ist vielleicht dadurch zu erklären, daß auch die Wirkung des Mg an sich noch nicht restlos klar ist. Erstens muß man nach HOMMERBERG **289)** in Rechnung stellen, daß Mg-Ionen an sich auch ohne Enzym den spontanen Zerfall der PhS-Ester beschleunigen, vielleicht ist darauf die absolute Notwendigkeit von Mg bei der Wirkung sehr schwacher Enzymlösungen auf anorg. Pyrophosphate nach LOHMANN zu erklären. Zweitens kann ein gewisser Grad von Mg-Aktivirung dadurch vorgetäuscht sein, daß es sich zunächst um eine Abschwächung der Hemmung durch Phosphate handelt. ERDTMANN **285)** hat darauf die gesamte Mg-Wirkung dahin zu erklären versucht, daß das Enzym mit dem Mg einen neuen Komplex bildet, der nun weniger empfindlich ist gegen die Hemmung durch Phosphat. JENNER und KAY **287/288)** aber finden eine Überschußhemmung durch Mg selbst (bei Ph. des Knochens und Blutes) mit einem Optimum der Aktivirung bei etwa 0,03 mol., während eben größere Dosen hemmen. Das Wirkungsoptimum des Mg liegt allgemein betrachtet in den Grenzen von qMg = 1,7 — 3,3, wobei als qMg der negative Logarithmus der Molarität von Mg bezeichnet wird. Aus diesem Grunde lehnen sie die Deutung von ERDTMANN naturgemäß ab, weil ja diese die Überschußhemmung nicht erklären könnte. Sie nehmen eine allgemeine kolloidchemische Beeinflussung des Enzymsystems durch Mg an. Bei Leberenzym fand aber wieder

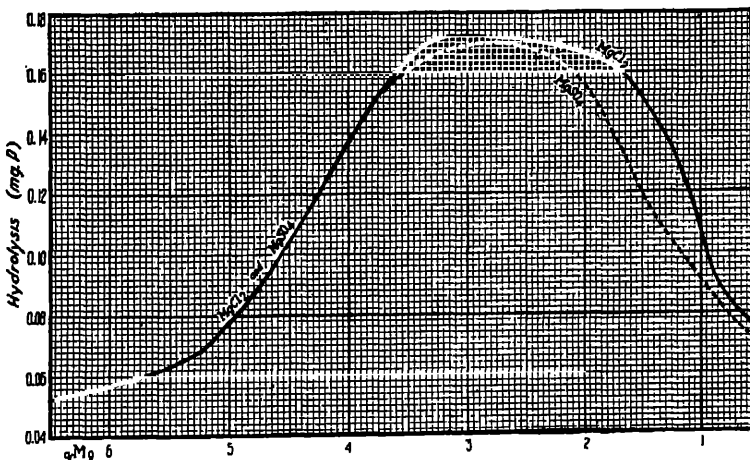



Abb. 17.
The *q*Mg-activity curve for the action of dialyzed kidney phosphatase on sodium β-glycerophosphate at pH 8.9 in the presence of increasing quantities of Mg. (*q*Mg = the negative logarithm of the molarity of Mg in the reaction mixture.) (JENNER u. KAY 288)).

288a) ***T. Satoh,*** Hydrol. der Adenosin-PhS etc. Jl. of Biochem. **21,** 19 (1935). S.A. — 289) ***Cl. Hommerberg,*** Mg-Aktiv. von tier. Phosphatasen. Bioch. Zs. **258,** 154 (1933).

BAMANN (l. c. 213) keine Überschußhemmung, hier geht die Aktivirung proport. der Konz. weiter, bis bei etwa m/50 bis m/20 die Vollaktivirung erreicht ist. Immerhin können diese Beobachtungen KAY's andere Befunde erklären, so die Angabe ROSSI's **290)**, daß Mg Knochenph. u. U. nur ganz wenig fördert oder sogar hemmt, und daß es auf Knorpelph. ohne Einfluß sein kann **(291)**. Nicht erklärt ist eine Angabe KEESER's **286)**, daß Ph. des Blutes durch ganz kleine Dosen Mg (m/100) gehemmt wird.

Taka verhält sich nach den japan. Autoren wieder anders: hier soll die Spaltung von β-Glycerol-PhS gehemmt werden, die von α gefördert. Aktivirt wird ferner die „Nukleophosphatase" KLEIN's **292)** (§ 284), die nun wieder nach TAKAHASHI **292a)** in der Wirkung identisch sein soll mit der „Phospho-diesterase" der Schule AKAMATSU, die UZAWA (l. c. 232) aus Schlangengift wirkungsrein isolirt haben will. Betr. Hefe sei wiederholt, daß die eine Ph. (ph 6—7) aktivirt wird (l. c. 267a), die andere (ph = 4) gehemmt (l. c. 225a).

Bakterienphosphatase (*Clostridium acetobutylicum, Propionibact. Jensenii*) wird durch Mg aktivirt, besonders deutlich ist das qMg-Optimum bei *Clostridium* erkennbar (PETT und WYNNE, l. c. 280); es werden alle Abarten der Ph. aktivirt.

Sehr interessant sind die Zusammenhänge, die BAMANN c. s. **293)** aufdeckten zwischen dem Grad der Aktivirbarkeit durch Mg und der mehr oder weniger festen Bindung des Enzyms an kolloide Massen. Je freier das Enzym ist, je mehr „Lyo-Enzym", desto höher ist die Aktivirbarkeit, sie sinkt mit zunehmender Molgröße des gesamten Enzym-Symplexes. In neutraler Lösung bleibt die Aktivirbarkeit konstant, in alkal. und saurer nimmt sie nach einigen Tagen erheblich ab, z. B. von 3000 % nach 4 Tagen bei saurer Reaktion auf 200 %. BAMANN führt diese Differenzen nicht auf Ballaststoffe zurück, sondern auf Änderungen des Enzym-Symplexes selbst.

Entgegen der Aktivirung durch Mg wird vielfach eine Hemmung durch **Ca-Ionen** angegeben (ERDTMANN **285)**, ROSSI **290)**, ODA (l. c. 261)). Es soll sich dabei nach KEESER **286)** um einen kolloidchemischen Ionenantagonismus handeln, womit ausgesagt wäre, daß sich sowohl die Mg- wie die Ca-Wirkung nicht auf den engeren Enzymsymplex, sondern auf das größere kolloide System richtet, insbesondere bzgl. der Aufladung. Jedoch scheint dies nicht generell zu gelten. Einerseits ist es zweifellos, daß Mg ein spezifischer Aktivator des Enzyms ist, insofern als anscheinend die Mg-Salze der Substrate besondere Affinität zum Enzym oder besonders hohe Zerfallsgeschwindigkeit haben; oder durch Verminderung der Phosphathemmung; und andererseits steht die Ca-Hemmung durchaus nicht allgemein fest.

MUNEMURA findet Ca fast ohne Einfluß; BAMANN (l. c. 293) bei der Leberph. mit opt. ph 5—6 gar keine Wirkung, bei der mit 9 ebenfalls keine oder sehr schwache Hemmung, KUWABARA **291)** bei Knorpelph. sogar Aktivirung.

Schwermetalle. HORII **294)** fand hemmend (auf seine „Tbc-Phosphatase") (n/10 mol. 1 : 20) Hg, Fe, Cu, Au, Al; in stärkerer Verdünnung (n/10 mol. 1 : 100) nur noch Hg, Fe, Au, Ni. Zink aktivirt Bakterienph. (l. c. 280), aber nur die Pyroph.; ist sonst nach ERDTMANN giftig.

Kupfer hemmt schon bei m/1200 (EDLBACHER l. c. 279). Mangansalze (Niere) je nach dem Substrat bald fördernd, bald hemmend (HORII **294)**). Nach MORII **295)** ist die Hemmung (Niere) durch Cu, Fe, Al bei Pyrophosphatasen stärker als bei Orthoph., so daß man bei genauer Dosirung die beiden Enzymtypen trennen kann.

---

290) ***A. Rossi,*** Fosfatasi delle ossa. Boll. Ital. Soc. Biol. **8,** H. 5 (1933). S.A. — 291) ***G. Kuwabara,*** Einfl. des Ca auf Knorpelphosphatase. Jl. of Biochem. **16,** 403 (1932). — 292) ***W. Klein,*** Nucleophosphatase. Zs. phys. Chem. **207,** 125 (1932). — 292a) ***H. Takahashi,*** Ferm. Dephosph. der Nucleinsäure. Jl. of Biochem. **16,** 463 (1932). — 293) ***E. Bamann, E. Riedel, K. Diederichs,*** Freileg. der Phosphatasen etc. Zs. phys. Chem. **230,** 175 (1935). S.A. — 294) ***J. Horii c.s.,*** Organphosphatase. Arb. III Abt. Inst. Kyoto C. H. 3, 7 (1932), BPh **72,** 725. — 295) ***M. Morii,*** Phosph. in der Rinderniere. ebd. C. H. 4 (1933), BPh **77,** 323.

Organische Stoffe. Die als Spaltprodukte auftretenden Stoffe, so Glycerol, scheinen im allgemeinen keine Wirkung zu haben (MARTLAND u. ROBISON **296**)).

Alkaloide: Morphin hemmt nach KEESER **297**) Blutph. mit Zunahme der Konz. von 0,002 bis 0,2 %, Codein unsicher. Chinin hemmt nach RIESSER **298**) schwach, nach ODA **299**) (Muskel, Leber) 1 : 10.000 ohne Einfluß. Miotin, das Esterasen stark hemmt, ist ohne Einfluß (STEDMANN c. s. **300**)).

Sulfhydryle (Cystein, Glutathion), nicht aber die Disulfide, hemmen bei schwach alkalischer R. (Glycerophosphat, Adenylpyro-PhS) (WALDSCHMIDT-LEITZ **301**), EDLBACHER **302**)); LOHMANN (l. c. 269) konnte bei neutraler Reaktion nur sehr geringen Einfluß finden; dies erklärt sich nach SCHÄFFNER **303**) dahin, daß jede Ph. nur bei ihrem opt. Ph. von SH-Gruppen gehemmt wird, also die Organph. bei ph = 9, Hefenph. bei 6,1. Eisensalze heben die hemmende Wirkung großenteils auf. Da nur die Hydrolyse, nicht die Synthese gehemmt wird, bei Gegenwart von Fe eher die Synthese, so nimmt WALDSCHMIDT-LEITZ an, daß hier wie auch bei anderen Enzymen (Arginase, Proteasen) nicht eine spezifische Vergiftung des Enzyms vorliegt, sondern eine Auswirkung des Redoxpotentials im Gleichgewicht 2 SH $\rightleftarrows$ S—S. KÖSTER und BERSIN **303a**) fanden aber Glutathion auch beim opt. ph ohne Wirkung, nur sehr hohe unphysiologische Dosen hemmen etwas; auch andere Thiole haben nur einen schwachen Einfluss, Thio-milchsäure fördernd, Dithiolactylsäure hemmend.

Insulin hat in vitro keinen Einfluß, weder auf die Zerlegung, (Zymophosphat, FORRAI **304**)), noch auf die Bindung an Zucker (BODNÁR **305**)); es ist also jedenfalls nicht einfach das „Coferment einer Phosphatese" wie man eine Zeitlang angenommen hatte.

Gallensäuren (Glycerol-PhS) hemmen stark: 0,1 % bei Niere um 13 %, bei Leber um 23 % (TAKATA **366**)), noch stärker bei Knochen; Synthese wird schwach gefördert, ebenso die PhS-Abspaltung aus Lecithin.

Eiweißabbaustoffe hemmen stark. Glycin (in Puffergemischen) bis 30 %, ebenso die Produkte der Autolyse in Rohpräparaten (BAKWIN c.s. **307**)), besonders aus Darmschleimhaut.

Hormone und Vitamine. Der Einfluß einiger solcher Wirkstoffe, die im biologischen Zusammenhang mit der Knochenbildung und der Knochenpathologie stehen, also Vitamin D und Parathyreoidea-Hormon, ist in der Idee geprüft worden, es könnten diese Stoffe irgend einen direkten Einfluß auf die Ph. haben. Soweit es sich um Injektionen in vivo handelt — auf die wir bei „Blut" (§ 291) zurückkommen werden — sind solche Zusammenhänge wohl möglich, insofern als die Ph. des Blutes und der Gewebe indirekt beeinflußt werden; die Vorstellung, daß die Hormone durch direkte Beeinflussung des Enzyms selbst in seinem natürlichen Milieu fördernd oder hemmend auf Stoffwechselvorgänge wirken können, gehört zu den absurden Problemstellungen, die uns leider auf dem Enzymgebiet auf Schritt und Tritt begegnen. Glücklicherweise hat sich überall im Enzymversuch die volle Wirkungslosigkeit

---

296) ***M. Martland, R. Robison,*** Bone phosphatase. Biochem. Jl. **21,** 665 (1927). S.A. — 297) ***E. Keeser,*** Morphin und Ferm. I, II. Arch. für exp. Path. **167,** 267, **171,** 311 (1932/3). S.A. — 298) ***O. Riesser,*** Phosphorsäureabspaltg. in überleb. Leber etc. Zs. phys. Chem. **161,** 149 (1926). — 299) ***Y. Oda,*** Einfl. von Chinin etc. auf die PhS-Abspaltg. etc. Jl. of Biochem. **6,** 367 (1926). — 300) ***E. Stedmann c.s.,*** Inhib. action of cert. urethanes etc. Biochem. Jl. **26,** 1214 (1932). S.A. — 301) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Scharikowa, A. Schäffner,*** Einfl. von SH-Verb. auf enz. Proz. Zs. phys. Chem. **214,** 75 (1933). S.A. — 302) ***S. Edlbacher, W. Kutscher,*** Phosphatase. Zs. phys. Chem. **207,** 1 (1932). — 303) ***A. Schäffner, E. Bauer,*** Einfl. von SH-Gruppen auf Phosphatase. Zs. phys. Chem. **225,** 245 (1934). S.A. — 303a) ***H. Köster, Th. Bersin,*** Schweinenieren-phosphatase. Zs. phys. Ch. **231,** 153 (1935). — 304) ***E. Forrai,*** Insulin und Fructose-di-PhS. Bioch. Zs. **189,** 150, 155 (1927). — 305) ***J. Bodnár, B. Tankó,*** Insulin und Phosphoryl. Bioch. Zs. **239,** 314 (1931). — 306) ***H. Takata,*** Einfl. der Gallensäuren auf Glycerophosph. Jl. of Biochem. **14,** 61, 439, **16,** 83 (1931/2), **18,** 63 (1933). — 307) ***H. Bakwin, O. Bodansky,*** Fact. influ. the . . . phosph. activ. Jl. of Biol. Chem. **101,** 641 (1933).

ergeben, sonst hätten wir noch wieder die endlosen Diskussionen über diese überflüssige Frage. MARTLAND u. ROBISON **296)**, ODA **299)** fanden Adrenalin und Pituitrin, sowie Thyroxin ohne Einfluß, HEYMANN **308)** und ROSSI **309)** bestrahltes Ergosterin, BAKWIN und BODANSKY **310)** Parathormon gegenüber HEYMANN, der in vitro eine Hemmung gefunden hatte. Nur Thyroxin soll nach HERR **312)** je nach der Konz. fördern oder hemmen. Förderung bei 10^{-20} und 10^{-14}, Hemmung bei 10^{-7}, Förderung bei 10^{-5} (Muskel). Bei Leber ähnliche Zahlen, bei Niere kein Einfluß (Zymophosphat, Glycerol-PhS).

Eine eigenartige Wirkung von Ascorbinsäure (Vitamin C) auf die Bildung und Spaltung von Fructose-PhS haben v. EULER c. s. **311)** beobachtet. Nach Bindung der PhS wird sie bei Gegenwart von Ascorbinsäure binnen 25 h wieder völlig frei, während Cu diese Wirkung hemmt. Es handelt sich auch hier um eine Beeinflussung der Redox-Lage zu gunsten der Spaltung, wie bei der Wirkung der Thiolkörper (s. o.).

III. Vorkommen und Bedeutung *).

§ **290.** Phosphatasen kommen überall vor (CLEMENTI **314)**), wo ein Stoffwechsel an den Hauptgruppen der Zellstoffe (§ 283) stattfindet, also in jeder Zelle; sie gehen aber auch in die meisten Sekrete und Abscheidungen über, s. z. B. DEMUTH **315)**.

HORII **316)** vermißte Ph. im Speichel (Speicheldrüse enthält sie), Magenschleimhaut, Galle, Pankreassaft, Harn; fand sie aber in Pankreaspräparaten, Darmsaft. In den Harn geht nach WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 225) nur die saure Ph. der Erythrocyten über.

Über die **Verteilung in Warmblüterorganen** liegen in den bisher zitirten Arbeiten verschiedene Befunde vor. Am ausführlichsten sind die von KAY **317)**. Er fand für die allgemein wirksame „alkalische" Gewebsphosphatase **(Phospho-Esterase)** bei Kaninchen, Katze, Mensch in entsprechend gleicher Relation für Glycerol-PhS, Zuckerphosphate und Nucleotide absteigend etwa: Duodenum, Jejunum, Ileum, Niere, Colon, Knochen, Lunge, Leber; ganz schwach Magen, Muskel, Gehirn, Pankreas, Parotis, Nebenniere, Arterien. Eine andere Reihenfolge gibt PELUZZO **318)** mit Hilfe der Spaltung von Borneol-PhS durch Gewebsextrakte (Hund): Pankreas, Niere, Gehirn > Leber, Milz, Hoden; fast null Haut und Muskel.

Dagegen fand KAY **319)** für **Pyrophosphat-Spaltung** (anorgan.) die Reihenfolge: Darm, wachsender Knochen, Niere, Lunge, Leber, ausgewachsener Knochen; sehr geringe Wirkung in Blutplasma, Muskel, Magenschleimhaut.

MACFARLANE c. s. **320)** fanden hoch wirksam bei Ratten, Kaninchen, Schweinen, Mäusen,

---

*) Sammelreferat von H. D. KAY 313).

308) ***W. Heymann,*** Wirkg. von bestrahlten Ergosterin etc. auf Gewebsphosph. Bioch. Zs. **227,** 1 (1930). — 309) ***A. Rossi, A. di Rienzo,*** Az. d. ergosterolo irrad. s. fosf. Boll. Soc. Ital. Biol. 8, 719, BPh **76,** 342. — 310) ***H. Bakwin, O. Bodansky,*** Eff. of parathormone on bone phosphatase. Proc. Soc. Exp. Biol. **31,** 64 (1933), BPh **79,** 196. — 311) ***H. v. Euler, T. Svensson,*** (Vitamin C auf Phosphatase) Ark. för Kemi **11,** B. Nr. 47 (1934). — 312) ***B. Herr,*** Einfl. des Thyroxins auf den Phosphatstoffw. Diss. Münster 1934, BPh **83,** 645. — 313) ***H. D. Kay,*** Chem. and metabol. of the comp. of phosph. Ann. Rev. of Bioch. **3,** 133 (1934). S.A. — 314) ***A. Clementi,*** Distrib. nell org. del pot. glicerof. Bull. Acad. Med. Roma **50,** (1923/4). S.A. — 315) ***Fr. Demuth,*** Hexosephosphatasen im menschl. Org. etc. Bioch. Zs. **159,** 415, **166,** 162 (1925). — 316) ***J. Horii c.s.,*** Organphosphatase. Arb. III, Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. 3 (1932), BPh **72,** 725. — 317) ***H. D. Kay,*** Phosphatase in mammal. tissues. Biochem. Jl. **22,** 855 (1928). S.A. — 318) ***A. Peluzzo,*** S. pres. nei tess. anim. di una fosfat. etc. Riv. di Pat. Sper. 8, 240 (1932), BPh **68,** 551. — 319) ***H. D. Kay,*** Pyrophosphatase. Biochem. Jl. **22,** 1446 (1928). S.A. — 320) ***M. G. Macfarlane, L. M. Brown Patterson, R. Robison,*** Phosph. activ. of animal tissues. Biochem. Jl. **28,** 720 (1934). S.A.

Average phosphatase content of the tissues.
Substrate, sodium glycerophosphate (KAY **317**).

Figures indicate average enzyme units per g. of original tissue (wet weight).

Tissue	Animal and number examined		
	Rabbit (3)	Cat (3)	Man (2)
Gastric mucosa	0·2	1·5	0·5
Duodenal mucosa	15·2	27·5	7·7
Jejunal mucosa	30·7	29·7	11·5
Ileal mucosa	16·1	23·9	13·6
Colon mucosa	5·3	10·0	3·7
Liver	3·6	1·1	0·8
Lung	3·2	7·6	1·0
Kidney	10·5	14·1	4·8
Spleen	5·6	0·9	1·0
Pancreas	—	0·7	—
Parotid gland	—	1·7	—
Suprarenal gland	—	—	1·3
Brain	1·0	0·8	0·6
Cardiac muscle	0·3	0·2	—
Skeletal muscle	0·2	0·2	—
Bone	6·0	3·0	—
Artery	—	Nil	0·1

Katzen, Hunden: Darmmucosa, Nierenrinde, Knochen, Zähne. Herzmuskel schwach, Skelettmuskel, Knorpel fast unwirksam. Junge Tiere haben in ihren Geweben mehr Wirkung als ältere. Neu aufgefunden Ph. in Gallenblase, Aorta (nur bei Ratten) und Trachea (bei den meisten Tieren).

Versuche an Organen von Hund, Rind, Kaninchen KOCH **321**): Hexose-di-PhS stark gespalten von Muskel, Leber, Niere. Glycerol-PhS sehr viel schwächer, in den einzelnen Organen wenig verschieden.

Bei **Feten** (Kaninchen) tritt Ph. etwa am 20. Tage auf, der Gehalt bleibt gering, und auch noch bei **Neugeborenen** geringer als bei erwachsenen Tieren; beim menschlichen Fetus ab 5. Monat keine wesentlichen Unterschiede gegenüber Erwachsenen (HORII **322**). KINARD **323**) fand bei Ratten Zunahme (Gesamtkörper) während der ersten 3 Lebenswochen, dann erst schnelles, dann langsameres Absinken. Zufuhr von Vitamin D bewirkt Zunahme, aber nicht zwischen dem 20. und 30. Tage.

Bei Fischen (Niere, Darm, Skelett) fanden BODANSKY c. s. **324**) mehr Ph. (Glycerol-PhS) bei Teleostiern (*Clupea, Scomber*) als bei Elasmobranchiem (z. B. *Mustelus, Raja*); es findet sich das Enzym sowohl im knöchernen wie im Knorpelskelett.

Bei Wirbellosen: Hämolymphe von Crustaceen und Schnecken enthält nur eine einheitliche Ph. im Gegensatz zum Blut höherer Tiere (ROCHE **325**)); Hepatopankreas von *Helix* enthält die Ph. mit extrem sauren opt. ph von 3,0 (KARRER l. c. 222).

Allgemeine biologische Bedeutung. Die gewaltige und ständig wachsende Bedeu-

321) ***L. Koch***, Gewebsphosphatasen, Diss. Münster 1933, BPh **82**, 663. — 322) ***J. Horii c.s.***, Phosphatase in Jungen und Fetus des Kaninch. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. 2, 37 (1931), BPh **66**, 638; ebd. H. 3, 7, BPh **72**, 725. — 323) ***F. W. Kinard, A. Chanutin***, Phosph. content of the whole rat etc. Jl. of Biol. Chem. **103**, 461 (1933). — 324) ***O. Bodansky c.s.***, Distrib. of phosphatase in the tissues of teleosts etc. Jl. of Biol. Chem. **94**, 551 (1931). — 325) ***J. Roche, M. Latreille***, Phosph. du sang etc. Soc. Biol. **116**, 1033 (1934), BPh **82**, 435.

Phosphatase activity (A/W) of mammalian tissues. Average values. Nach **320**).

A = inorganic phosphate (mg. P) liberated from 0·1 *M* Na β-glycerophosphate in 48 hours at p_H 8·6 and 25°.
W = weight of tissues (mg.).

Final conc. of $MgSO_4$ added	None						0·003 *M*					
Animal	Rat	Rabbit	Guinea-pig	Mouse	Cat	Dog	Rat	Rabbit	Guinea-pig	Mouse	Cat	Dog
No. of animals examin.	3	3	1	2	1	1	3	3	1	2	1	1
Age of animals (weeks)	4	6-8	4	12	9	5	4	6—8	4	12	9	5
Tissue												
Femur epiphysis	0·25	0·22	—	—	—	—	0·60	0·56	—	—	—	—
Costochondral junction	0·28	0·53	—	—	0·88	0·73	1·10	1·10	—	—	3·18	2·40
Rib cartilage	<0·01	<0·01	<0·01	<0·02	0	0	0·02	<0·01	—	<0·02	0·01	0·03
Trachea	0·03	<0·01	<0·01	<0·02	0·03	0·02	0·12	0·02	0·06	0·02	0·14	0·27
Intestinal mucosa	—	0·43	2·1	0·67	3·0	2·6	—	1·13	2·42	6·77	7·75	11·8
Kidney cortex	0·38	0·16	0·32	0·66	0·46	0·41	0·55	0·22	0·79	2·70	1·50	1·4
Bladder	0·07	0·06	0·07	0·13	0·06	0·03	0·16	0·16	0·13	0·50	0·35	0·08
Aorta	0·09	<0·01	<0·01	<0·01	0	0	0·38	<0·01	<0·01	0?	0?	0
Dorsal aorta	0·09	<0·01	—	0	—	0	0·38	<0·01	—	0	—	0
Cardiac muscle	—	0·01	0·03	0·05	0·01	<0·01	—	0·02	0·05	0·09	0·04	0·02
Skeletal muscle	<0·01	—	0·02	0·03*	0·01	—	—	—	—	0·10*	0·01	0·01
Lung	0·17	0·07	0·10	0·06	0·11	0·05	0·61	0·20	0·25	0·10	0·21	0·28
Liver	0·03	0·06	0·02	0·03	0·02	0·06	0·05	0·12	0·04	0·06	0·07	0·26
Spleen	—	0·07	—	0·03	0·03	0·09	—	0·21	—	0·15	—	0·36
Pancreas	—	0·03	—	0·03	0·02	0·11	—	0·06	—	0·04	0·04	0·36
Thyroid	0·16	0·02	0·03	0·12	0·02	0·01	0·41	0·05	0·13	0·30	0·07	0·04
Adrenal	0·09	0·03	0·33	0·02	0·06	0·03	0·26	0·05	0·73	0·05	0·29	0·11
Thymus	—	0·06	—	0·03	—	0·11	—	0·07	—	0·10	—	0·48

* Intercostal muscle.

tung, welche verschiedenartige Verbindungen der Phosphorsäure im Stoffwechsel spielen, läßt es mit Sicherheit annehmen, daß auch die auf diese Verbindungen wirksamen Fermente zu den wesentlichen Werkzeugen der Zelltätigkeit gehören. Aus den Ausführungen in den Abschnitten 283 und ff. geht ja klar hervor, daß Anlagerung und Ablösung von PhS die allerwichtigsten Vorgänge im Stoffwechsel der Kohlenhydrate und Fette begleiten, und daß auch im Eiweißstoffwechsel an den Phosphorproteinen und im Nucleinstoffwechsel der Zellkerne Phosphatasen mitwirken. Man kann also ihre Bedeutung nicht leicht überschätzen. Es kommt noch hinzu, daß ihnen noch eine ganz besondere Rolle zusteht, nämlich die Zerlegung der durch das Blut herangeschafften PhS-Ester durch die Ph. der Knochen zum Zwecke der Neubildung von Calciumphosphaten im wachsenden Knochen, und die Ph. der Niere zum Zweck der Ausscheidung der Phosphate im Harn. Es ist also nicht zu verwundern und an sich zu billigen, wenn nun die rein biologische und vor allem auch die pathologisch-klinische Forschung sich intensiv des Studiums der Ph. des Blutes und der Gewebe bei allerlei Störungen des Stoffwechsels etc. angenommen hat. Leider lassen auch hier wieder wie so oft bei derartigen Fermentarbeiten besonders klinischen Zieles die Problemstellungen ebenso wie die Arbeitsmethoden häufig jede Sicherheit vermissen. Wir geraten leider nun auch bei den Ph. in jene Massenproduktion von Arbeiten hinein, die zum größten Teil von vornherein verfehlte Ziele verfolgen und dazu häufig auch noch methodisch ganz unzureichend sind. Es führt schon zu zwecklosen Kontroversen, wenn man sich nun bemüht, bei allerlei Störungen irgendwelche Verschiebungen im Ph.-Gehalt etwa des Blutes aufzusuchen. Es wird immer wieder vergessen, daß der „Fermentgehalt" irgend eines Gewebes immer eine Resultante der verschiedensten und noch gänzlich unbekannten Faktoren ist. Noch schlimmer aber wird es, wenn man nun die Wirkung irgend welcher therapeutischer Maßnahmen an einer Änderung dieses Fermentgehaltes prüfen oder gar die Wirkung eines solchen therapeutischen Agens auf eine direkte Beeinflussung des Fermentes selbst zurückführen will, auf eine „Vermehrung" oder „Verminderung" oder Aktivirung oder dergl. Solche Arbeiten verkennen den Zusammenhang zwischen dem nachprüfbaren Verhalten irgend eines Fermentes in irgend einem biologischen Objekt und der physiologischen Rolle, welche das Ferment grade bei irgend einem pathologischen Ablauf spielt, vollständig. Es ist mit wenigen Ausnahmen prinzipiell nicht möglich, feste Relationen zwischen dem pathologischen Vorgang und dem Fermentgehalt des betroffenen Organes selbst, des Blutes oder des Harnes zu erweisen. Mit diesen Vorbehalten müssen also hier — wie bei anderen Fermenten auch — die Arbeiten über biologische und vor allem pathologische Veränderungen des Ph.-Gehaltes gewertet werden.

Selbstverständlich machen davon jene Arbeiten eine Ausnahme, die mit exakter Methodik einen bestimmten Gewebsstoffwechsel erforschen, so hier den Umsatz der Phosphate im Muskel, in Blut etc., und vor allem den Umsatz der Phosphate im Knochen. Ein weiteres greifbares Ziel ist die Untersuchung, inwieweit die besonders wirksame Ph. der Niere Anteil hat an der Regulirung der Ausscheidung von anorg. Phosphat im Harn, also an der Regelung des Ca-P-Stoffwechsels. Hier wie beim Knochen scheinen die Zuckerphosphate die Transportform der PhS zu sein, die das Blut dorthin bringt, wo sich die wichtigen chemischen Vorgänge des Phosphorstoffwechsels vollziehen. Dagegen ist bisher bei den Arbeiten über Zusammenhänge des Allgemeinstoffwechsels mit dem Nachweis von Ph. herzlich wenig herausgekommen, wie wir im Einzelnen sehen werden. Immerhin liegen auch hierfür einige wenige mit einigermaßen klarer Problemstellung und moderner Methodik durchgeführte Arbeiten vor.

Speziell über die Beziehungen zwischen Tumoren und dem Phosphatasegehalt von Blut

und Geweben hat KÖHLER 326) folgende Befunde mitgeteilt: im tumorkranken Organismus finden Umwandlungen der Phosphatase in Muskeln, Niere und Blut statt, die sich sowohl in der — durch Mg erzielbaren — Gesamtwirkung wie auch in dem Grade der Aktivirbarkeit äußern. (Glycerol-PhS). Während in Muskel und Niere gesunder Tiere die vorhandene Ph. voll aktiv ist, ist sie bei Tumortieren nur zu 30 % aktiv. Das Blut solcher Tiere hat stark erhöhten Gesamtgehalt und Aktivirungsgrad (bis auf das Doppelte). Es scheint ein Aktivator aus den Geweben ins Blut abgegeben zu werden. Niere hat mit Alterung des Tumors erst erhöhte Gesamtmenge, dann Abnahme, Muskel Verminderung. Tumor-resistente Ratten zeigen von selbst erhöhte Ph. in der Niere. Die anderen Arbeiten lassen sich nicht auf ein derartig generelles Ziel zurückführen, wir werden ihnen bei den einzelnen Organen begegnen, z. B. weiteren Befunden an Tumorträgern bei Muskel; angeblichen Befunden bei Avitaminose B bei Leber etc.

§ 291. **Blut.** Hier muß man nach allen bisher vorliegenden Arbeiten die Ph. des Plasma streng scheiden von der der Erythrocyten, die einen anderen Typus vertritt (s. die ph-Tabelle § 289); es ist hier nur die saure Ph. vertreten, die allein aus den roten B.K. stammen soll (l. c. 255). Im Anfang, nachdem man überhaupt die zuerst vermißte Ph. des Blutes gefunden hatte (LAWACZEK 326a), MARTLAND, ROBISON c. s. 327), 327a)) hielt man das noch nicht auseinander, und fand deshalb für das Gesamtblut den mittleren opt. ph von 6,0—7,0 (MARTLAND, ROBISON 327), RONA 328)). Später wurde die Plasma-Ph. mit ihrem ph von ca. 9 besonders von KAY 329), die der Erythrocyten von ROCHE 330) und HORI 331) untersucht (ph = 4—6).

Bei Mensch und Kaninchen soll nach UMENO 332) zwar in Leukocyten Ph. vorhanden sein, aber in Erythrocyten fehlen (?). Taube enthält beide Ph., Wirbellose nur eine (ROCHE 333)). Beim Haushuhn sind die Werte bei jungen Tieren ♀ und ♂ gleich, bei Legehennen und in der Mauser höher (COMMON 334)). Beim Menschen ist sie am reichlichsten beim Säugling, nimmt dann rasch ab, erreicht bei 25 Jahren ein Minimum und steigt dann wieder (JÄGER 335)). BODANSKY 340) fand dagegen bei Mensch und Hund kontinuirliche Abnahme, der Gehalt ist bei jungen Tieren stark abhängig vom Ernährungszustand.

Die Serumphosphatase scheint nur ein aus den verschiedensten Organen ausgeschwemmtes Enzym zu sein. Beim Menschen soll nach BODANSKY 336) die Ph. z. T. aus der Leber bzw. Galle stammen, da sie bei Icterus und Unterbindung des Gallenganges regelmäßig vermehrt ist, ebenso ROBERTS 337), aber nur bei Obstruktionsicterus, nicht bei toxischem. In anderen Fällen stammt sie aus den Knochen (s. u.).

Methodisches zur vergleichenden Bestimmung s. JENNER und KAY 338), ferner BODANSKY (l. c. 201) und RACE 339); Vergleich der Methoden nach JENNER-KAY und

326) ***F. Köhler***, Bilanz der Phosphatase im tumorkranken Org. Zs. phys. Chem. **228**, 97 (1934) S.A. — 326a) ***H. Lawaczek***, Dynamik der Phosphorsäure des Blutes. Bioch. Zs. **145**, 351 (1924). — 327) ***M. Martland, R. Robison***, Estim. of phosph. in blood. Biochem. Jl. **18**, 765 (1924); ***Dies., F. S. Hansmann***, Phosph. esterase of blood. ebd. **18**, 1152 (1924). S.A. — 327a) ***M. Martland***, Phosph. ester. of blood at var. conc. ebd. **19**, 117 (1925). S.A. — 328) ***P. Rona, K. Iwasaki***, Verteil. des P im Blut. Bioch. Zs. **174**, 293 (1926). — 329) ***H. D. Kay***, Plasma phosphatase. Jl. of Biol. Chem. **89**, 235, 249, **91**, 135 (1930/1). — 330) ***J. Roche***, Blood-phosphatases. Biochem. Jl. **25**, 1724 (1931). S.A. — 331) ***W. Hori***, Phospho-monoesterase. Jl. of Biochem. **16**, 433 (1932). — 332) ***M. Umeno***, Phosphatase V. Bioch. Zs. **231**, 339 (1931). — 333) ***J. Roche, M. Latreille***, Phosph. du sang etc. Soc. Biol. **116**, 1033 (1934), BPh **82**, 435. — 334) ***H. Common***, Serumphosphatase in the domest. fowl. Nature **1934**, I, 572. — 335) ***O. Jäger***, Hexose-Monophosphatase. Zs. Kind. **44**, 358 (1927), **46**, 159. (1928), S.A. — 336) ***A. Bodansky, H. L. Jaffé***, Phosphatase Stud. IV. Proc. Soc. Exp. Biol. **31**, 107, 1179 (1933/4). — 337) ***W. M. Roberts***, Blood phosphatase etc. Brit. Med. Jl. **1933**, Nr. 3773, BPh **74**, 486. — 338) ***H. D. Jenner, H. D. Kay***, Plasma-Phosphatase. Brit. Jl. exp. Path. **13**, 22 (1932). — 339) ***J. Race***, (Phosphatase). Arch. Med. Hydrol. **10**, 1798 (1932), cit. n. KAY l. c. 313.

nach BODANSKY durch PALMER **339a)**, Empfehlung der letzteren für Reihenversuche.

Beziehungen zum Allgemeinstoffwechsel: Abnahme bei Hunger (BODANSKY **340)**), Unterernährung und Blutverlusten; bei Hunden und Katzen bei kohlenhydratreicher Nahrung mehr Ph. im Serum als bei Fleischkost (FREEMANN c. s. **341)**). Körpertemperatur, Asphyxie ohne Einfluß (BINET **342)**). Die Erhöhung nach KH soll nach BODANSKY **343)** mit der erhöhten Umsatztätigkeit der Organe (Phosphorylirung) zusammenhängen.

MARTLAND **327a)** bringt die von anderer Seite nachgewiesenen Schwankungen im Phosphatgehalt des Blutes bei Acidosis und Alkalosis mit der von ihr gefundenen Tatsache in Beziehung, daß der normale ph des Blutes, 7,3—7,35, eine Art Wendepunkt in der Tätigkeit der Blutphosphatase darstellt: oberhalb 7,35 wird die Synthese begünstigt, unterhalb 7,3 die Spaltung. Die bei Rachitis gefundene Vermehrung der freien Phosphate ist aber inzwischen anders erklärt worden, nämlich durch eine Vermehrung der Phosphatase an sich (s. u.).

Abhängigkeit von der Schilddrüse: Nach Injektion von 2—5 mg Thyroxin Steigerung auf das 2—3fache (Hund); nach einer Woche Rückkehr zur Norm (SCOZ **340a)**; dementsprechend Abnahme bei Myxoedem und Kretinismus (BODANSKY **343)**, SMITH **344)**).

Gravidität (Wiederkäuer): geringe Abnahme; Eierlegen bei gesunden Vögeln ohne Einfluß **334)**.

Verminderung angegeben bei Muskeldystrophie, Polyomyelitis; Zufuhr von Glucose erhöht den Gehalt (ZIEGLER **345)**).

Vermehrung bei Anaemien (meist) (ROBERTS **337)**); bei Zerfall von Leucocyten (FREEMANN **341)**) und bei tumorkranken Menschen (KAY **329)**), besonders stark bei Tumor-Ratten (KÖHLER l. c. 326); ferner bei chronischer myeloischer Leukämie; keine Aenderung bei akuter lymphatischer; ebenso die Organe **341a)**. Vermehrung auch bei Leberaffektionen, Stauungsicterus (**345a)**). Starke plötzliche Vermehrung nach Exstirpation des Pankreas BINET **341b)**.

Tuberculose wechselnde Bilder je nach Art der Krankheit (BINET **342)**); Abnahme bei schlechtem Allgemeinzustand; bei gutartigem Verlauf, aber auch bei Komplikationen mit Diabetes sowie bei Knochen-Tbc. Zunahme.

Beziehungen der Plasmaphosphatase zum Kalk-PhS-Stoffwechsel. Nachdem es ersichtlich geworden war, daß die Knochenphosphatase in Beziehungen steht zum Ca-P-Stoffwechsel und zur Knochenneubildung (s. u.), hat sich naturgemäß das Interesse auch den Organ- und Plasmaph. zugewendet. Insbesondere hat die Tatsache, daß bei Rachitis die Knochenph. kaum verändert, die Plasmaph. aber meist stark vermehrt ist, zu allerlei Überlegungen in dem Sinne Anlaß gegeben, ob nicht etwa diese starke Anreicherung der Blutph. in der Art mit der Pathogenese der Rachitis zu tun habe, daß sie das Blut an dem Rohprodukt der Verkalkung in den Knorpeln, den organischen Phosphaten verarmen macht; darüber s. u. Nach ROBISON **346)** ist bei rachitischer

339a) ***L. S. Palmer, J. W. Nelson***, Phosphatase in plasma etc. Proc. Soc. Exp. Biol. **31**, 1070 (1934) BPh. **85**, 407. — 340) ***A. Bodansky, H. L. Jaffé***, Eff. of diets etc. on plasma phosphatase. Proc. Soc. Exp. Biol. **29**, 199 (1931). — 340a) ***G. Scoz, P. L. Marangoni***, Az. d. tiroxina s. potere fosfat. del plasma. Boll. Soc. Ital. Biol. **9**, 973 (1934), BPh **84**, 466. — 341) ***S. Freemann, Ch. J. Farmer***, Influ. of bleeding etc. on serum phosph. Proc. Soc. Exp. Biol. **31**, 536 (1934), BPh **80**, 129. — 341a) ***R. Iwatsuru, Y. Minami***, Phosphatase in Blut etc. Bioch. Zs. **268**, 394 (1934). — 341b) ***L. Binet, I. Pautrat***, Phosph. plasm. au cours du diab. pancr. Soc. Biol. **116**, 709 (1934) BPh. 84, 646. — 342) ***L. Binet, I. Pautrat***, La phosphatase plasmat. chez les tuberc. C. R. **197**, 945 (1933), Arch. de méd. chir. appar. resp. **8**, 531 (1933), BPh **80**, 511. — 343) ***A. Bodansky***, Phosphatase studies VI, VII. Jl. of Biol. Chem. **104**, 473, 717 (1934). — 344) ***J. Smith***, Plasma phosph. in rickets etc. Arch. Dis. Childh. **7**, 149, **8**, 215 (1933), BPh **70**, 387, **81**, 518. — 345) ***M. R. Ziegler c.s.***, Variat. in plasma phosph. etc. Proc. Soc. Exp. Biol. **28**, 913 (1931). — 345a) ***C. H. Greene c.s.***, Phosph. cont. of the blood serum in jaundice. Jl. of clin. Invest. **13**, 1079 (1934). BPh **85**, 408. — 346) ***R. Robison, K. M. Soames***, Defect. ossific. in rachitic animals. Biochem. Jl. **19**, 153 (1925).

Kost (Ratten) der Gehalt des Blutes sowohl an anorg. Phosphat wie an enzym-spaltbaren Estern normal. Die mangelhafte Knochenbildung kann damit nicht zusammenhängen. Bei anderen Diäten ist tatsächlich zu wenig Phosphorsäure vorhanden. Jedenfalls aber sind nicht nur bei Rachitis, sondern auch bei vielen anderen Erkrankungen der Knochen erhebliche Steigerungen des Gehaltes an Plasmaph. beobachtet worden. Allgemeine Beziehungen behauptet AUSTONI (l. c. 386): es soll sich bei allen toxischen und hormonalen Einflüssen die Ph in den Knochen und im Blute in umgekehrter Richtung verändern. Folgende Einzelbeobachtungen seien hier wiedergegeben:

Rachitis starke Vermehrung KAY (l. c. 329), ROBERTS **347**), SMITH **345**), **348**), BODANSKY **349**), CORYN **350**); ebenso bei Mangel an Vitamin A und D (SMITH); dem widersprechend bei Rachitis keine Vermehrung, gemessen an Zymophosphat (HEYMANN **351**)), an Monophosphat und an den zelleigenen Estern der Blutkörper JAEGER (l. c. 335); Abnahme bei antirachitischer Behandlung von Kindern **349**, **351a**).

Osteitis deformans (PAGETsche Krankheit) starke Erhöhung (KAY l. c. 329, **352**, **353**), ROBERTS; nach KAY bis auf das 20fache, ebenso Osteitis fibrosa, ebenfalls enorme Vermehrung BODANSKY, CORYN; dieselben geben geringere Zunahmen bei allerlei anderen Knochenerkrankungen an. Scorbut der Kinder keine Veränderung, aber während der Heilung starkes Ansteigen (SMITH). Bei Hühnern mit Beinschwäche starke Vermehrung (**353a**).

Bei Ca-armer, P-reicher Ernährung (Schaf) Ansteigen bis auf das 4fache als sicheres Zeichen gestörten Stoffwechsels (**353a**). Zusatz von bestrahltem Ergosterin resp. U.V.-Bestrahlung des Blutes selbst soll nach FRONTALI **354**) die Spaltung von Hexose-Ph. steigern.

Über den Ca-P-Stoffwechsel hat man weiter Beziehungen zum diesbzgl. endokrinen System gesucht. Die Parathyreoidea scheint nach BODANSKY **355**) nur indirekt über die Knochen zu wirken; er sah bei Hunden Ansteigen des Gehalts, bei *Cavia* aber erst Senkungen, dann Ansteigen bis über die Norm. Bei Hyperparathyreoidismus Erhöhung auf das 10fache (BODANSKY **355**)). PAGE c. s. **356**) sahen nach Injektionen von Parathormon Ansteigen der Blutph., aber Hemmung der Knochenph.

Zur Übersicht seien noch folgende Angaben aus einer Arbeit von BODANSKY **349**) wiedergegeben, in der er seine Untersuchungen zusammengestellt hat. Die Plasmaph. hat bei gesunden Erwachsenen einen Wert von i. M. 2,5 Einheiten (1,5—4,0) je 100 cm³. Bei Kindern i. M. 7 (5—14). Pathologische Steigerungen: Leber- und Knochenstörungen, Abnahmen nur bei fortschreitendem Alter, Anaemien und Kachexien. Sonst bei allen Krankheiten normale Werte. Mit dem Lebensalter erst (2—10 Jahre) langsame, dann schnellere Abnahme. Knochenerkrankungen bewirken Zunahme nur bei Neubildungsprozessen am Knochen, ferner bei lokaler Atrophie an Knochen, auch Osteomalacie, besonders aber Rachitis. Bei rachitischen Kindern Werte von 30—190 E., nach Lebertran Absinken. Erhöhung auch bei Tumoren der Knochen. Die hohen Ph.-Werte im Blut sind Zeichen einer specifischen Reaktionsbereitschaft bei Störungen der Funktionen.

---

347) ***W. M. Roberts***, Var. in the phosph. activ. of the blood. Brit. Jl. exp. Path. **11**, 90 (1930). — 348) ***J. Smith, M. Maizels***, Plasma phosph. in rickets and scurvy. Proc. Roy. Soc. Med. **25**, 705 (1932), BPh **67**, 666. — 349) ***A. Bodansky, H. L. Jaffé***, Serum phosph. in dis. of bone. Arch. of int. Med. **54**, 88 (1934), BPh **83**, 402. — 350) ***G. Coryn***, Phosphatases du sang. Jl. de Chir. Belge **5**, 213 (1934), BPh 81, 519. — 351) ***W. Heymann***, Blut- und Organphosphatasen. Zs. Kind. **49**, 761 (1930). — 351a) ***O. Andersen***, Plasmaphosph. bei.... Kindern. Jb. Kindh. **144**, 94 (1935), Ch. Cbl. **1935**, I, 3148. — 352) ***H. D. Kay***, Plasma phosphatase in osteitis deform. etc. Brit. Jl. exp. Path. **10**, 253 (1929). S.A. — 353) ***H. D. Kay, S. L. Simpson, G. Riddock***, Osteitis deformans. Arch. of int. Med. **53**, 208 (1934). S.A. — 353a) ***D. W. Auchinachie, A. R. G. Emslie***, Eff. of diet on the plasma-phosphatase. Biochem. Jl. **27**, 351 (1933), **28**, 1993 (1934). — 354) ***G. Frontali***, Fosfatemia e rachitismo. Riv. Clin. Ped. **32**, 897 (1934), BPh **83**, 548. — 355) ***A. Bodansky, H. L. Jaffé***, Plasma phosphatase in exp. hyperparathyr. Jl. of Biol. Chem. **92**, XVI (1931). — 356) ***J. H. Page, D. M. Reside***, Wirkg. von Parathyr. auf Blutphosphatase. Bioch. Zs. **226**, 273 (1930).

§ 292. Knochen *). Die bereits im H.W. (S. 520) kurz erwähnte Auffindung einer kräftig wirkenden Ph. in jugendlichen noch wachsenden Knochen an der Ossifikationsgrenze (im hypertrophirenden Knorpel und den Osteoblasten) und in Zähnen durch ROBISON **357—365)** hat eigentlich den Hauptanstoß gegeben, die Forschung über diese Fermente zu intensiviren und ihre biologische Bedeutung zu diskutiren. Die Eigenschaften dieses Enzyms, seine Spezifitätsgrenzen — es greift nach **(358)** Butyrate, nach **(359)** Lecithine nicht an —, sein auffallend hoher opt. ph von ca. 9 **(358)** etc. sind in den vorangegangenen Abschnitten als charakteristische Merkmale der allgemein verbreiteten unspezifischen „alkalischen" Gewebsph. („Phospho-Esterase") beschrieben worden.

ROBISON c. s. zogen aus diesen Befunden den Schluß, daß hier ein allgemein vorhandenes Zellenzym einmal eine ganz besondere singuläre Stoffwechselfunktion hat: es fängt aus dem Blute **(359), 360), 362)** die dort vorhandenen PhS-Ester (nach unseren heutigen Kenntnissen vorwiegend Zuckerphosphate und Diphospho-glycerinsäure) ab, zerlegt sie und lagert die freigesetzte PhS als Ca-Salz an den Ossifikationsgrenzen zur Knochen-Neubildung ab. Durch die starke Vermehrung von PhS-Ionen wird das Löslichkeitsprodukt an $Ca_3(PO_4)_2$ überschritten, und dieses Salz scheidet sich ab. Über die Komplikationen dieses Vorganges s. u. Die Zerlegung der PhS-Ester des Blutes, nicht der Phosphatide, wurde direkt nachgewiesen.

Das Hauptargument ist, daß das Enzym nur an den Verknöcherungszentren zu finden ist: fetale Epiphysen, Knorpel außerhalb der Ossifikationslinie etc. sind frei von Ph. **(361)**; ausgewachsene Knochen sind arm an Ph. Nach POLICARD **366)** ist sowohl bei normalen wie bei rachitischen Röhrenknochen Ph. zu finden in der Knorpelwucherung und der Ossifikationszone, wenig in der Spongiosa der Metaphyse.

Das reichlichere Vorkommen in jugendlichen Knochen (besonders beim Fetus) wurde verschiedentlich bestätigt. KAY **367)** gab es auch für Pyrophosphatase an; YAMANE **367)** hat es in eingehenden Versuchen an Kaninchen, Rind und Mensch gefunden. Die Ph. steigt beim Kaninchen von der Fetalzeit bis etwa zum 30. Lebenstage und fällt dann allmählich ab. Die Knorpel enthalten garkeine Ph. außer denen, die später verkalken (Rippenknorpel, Schildknorpel des Rindes); diese enthalten etwas Ph.; nur Epiphysenknorpel reichlich; Periost und kompakte Knochensubstanz wenig. Dieselbe Funktion hat die Phosphatase in den Zähnen (MACKENZIE **369)**).

Neben diesem enzymatischen Mechanismus mag es, wie ROBISON **364), 365), 370)** gegenüber SHIPLEY anerkennt, einen zweiten geben, der auf einer einfachen Erhöhung des ph durch die Osteoblasten beruht; auch dann fallen $Ca_3(PO_4)_2$ und $CaCO_3$ aus.

Im Versuch kann eine Ablagerung auch ohne Enzym eintreten, wenn man Knochen-

---

*) Zusammenfassung: ***R. Robison***, Bone Phosphatase, Erg. Enzymforsch. I, 280 (1932).

357) ***R. Robison***, Possible signif. of hexosephosph. acid in ossific. I. Biochem. Jl. **17**, 286 (1923). S.A. — 358) ***Dies., K. M. Soames***, do II, Phosphor. esterase in ossif. cartilage. ebd. **18**, 740 (1924). — 359) ***H. D. Kay, R. Robison***, do III, Action of bone enzyme on the org. phosph. comp. ebd. **18**, 755 (1924). — 360) ***H. W. Goodwin, R. Robison***, do IV, The phosph. esters of blood. ebd. **18**, 1161 (1924). — 361) ***M. Martland, R. Robison***, do V, The enzymes in the early stage of bone developm. ebd. **18**, 1354 (1924). — 362) ***Dies.***, do VI, Phosph. esters in blood plasma. ebd. **20**, 847 (1926). — 363) ***Dies.***, do VII, Bone phosphatase. ebd. **21**, 665 (1927), **23**, 237 (1929). S.A. — 364) ***R. Robison, K. M. Soames***, do VIII, Calcific. in vitro. ebd. **24**, 1922 (1930). S.A. — 365) ***R. Robison, M. Macleod, A. H. Rosenheim***, do IX, Calcific. in vitro. ebd. **24**, 1927 (1930). S.A. — 366) ***A. Policard, J. Roche c.s.***, Répart. histol. de la phosphatase etc. Bull. Histol. appl. **8**, 171 (1931). S.A. — 367) ***H. D. Kay***, Funct. of a phosphatase in bone form. Brit. Jl. Exp. Path. **7**, 177 (1926). S.A. — 368) ***T. Yamane***, Phosphatase etc. von Knochen und Knorpel. Arb. III, Abt. Anat. Inst. Kyoto C, H. 2, 3 (1931/2), BPh **66**, 638, **72**, 726. — 369) ***A. S. E. Mackenzie*** (Phosphatase in Zähnen). Brit. Dental Jl. **54**, 133 (1933); cit. n. KAY (l. c. 313). — 370) ***R. Robison***, Reply to SHIPLEY c.s. (Knochenphosphatase). Biochem. Jl. **20**, 388 (1926) S.A.

streifen rachitischer Ratten in anorganische Lösungen mit geeigneten Mengen Ca und PO_4 bringt; und zwar muß [Ca] × [PO_4] 30—40 betragen. Das ist aber nichts besagend für die physiologische Wirkung, da diese Konzz. nicht, wie SHIPLEY c. s. angeben, denen des Serums entsprechen, was die Ionen anlangt, da im Serum die Proteine die Ionenkonz. an Ca erheblich erniedrigen. Die physiologische Verkalkung braucht also jedenfalls auch die Spaltung der organischen Phosphate, die die Ausnützung der anorg. Phosphate wesentlich verbessert, auch wenn nur wenig organ. Phosphat gespalten wird (**364**).

Es zeigte sich nämlich (**364, 365**), daß der Prozess nicht einfach darauf beruht, daß die Ph. alles nötige Phosphat aus organischen Estern abspaltet. Es gelingt zwar wie erwähnt durch Behandlung rachitisch gemachter Knochen (Femur, Tibia von Ratten) in vitro mit bestimmten Konzentrationen von Ca^{++} und Phosphat Verkalkung zu erzielen, aber in sehr wechselvoller und sowohl von den Konzentrationen, wie von den begleitenden Salzen, besonders $NaHCO_3$ abhängiger Ausdehnung. Carbonat geht mit in die Ablagerung ein, die also wahrscheinlich aus Carbono-Phosphaten besteht; ohne $NaHCO_3$ bedarf es wesentlich höherer Konzz. NaCl hemmt bei 0,2 %, Mg bei > 0,08 mM. Die Verkalkung wird aber durch sehr geringe Mengen Glycerophosphat stark gesteigert, resp. unter bestimmten Bedingungen überhaupt ermöglicht. Es liegen hier also zwei verschiedene Prozesse vor. Die Abspaltung von zusätzlicher PhS aus den organischen Estern führt eine übersättigte Lösung von anorg. Phosphaten herbei, und aus dieser nehmen die Zellen der Knorpel-Knochengrenze die zur Verkalkung nötigen Ca-Phosphate in einer komplizirten und noch wenig bekannten Weise auf. Denn selbstverständlich ist mit der Abspaltung von PhS an sich noch garnichts gesagt. Es enthalten ja auch andere Organe, wie z. B. die Niere, sehr kräftige Ph. und verkalken doch nicht. Allerdings ist nach KAY (l. c. 323) der Gehalt der Niere bei Feten = null; bei jungen Kindern noch klein. Es bleibt also immer noch eine „Affinität" der Zellen zum Ca-Phosphat beim ossifizirenden Knorpel, über die wir noch wenig wissen. Die notwendige sehr geringe Menge an organischem Phosphat erklärt auch die Tatsache, daß trotz sehr kleiner Konz. dieser Ester im Plasma — sie finden sich ja vorwiegend in den Erythrocyten, sowie Leukocyten und Plättchen — dieser enzymatische Prozeß bedeutungsvoll ist (vgl. die Diskussion der gegen ROBISON's Theorie erhobenen Einwände bei KAY **367**). Schwierigkeiten bietet noch die Tatsache, daß auch bei Rachitis etc. die Knochenph. vorhanden ist, wir kommen darauf gleich zurück.

Den „zweiten Prozeß", die Ablagerung, haben ROBISON und ROSENHEIM **371**), **372**) genauer untersucht. Es wurden rachitische Knochen in einer Stammlösung mit verschiedenen PhS-Estern behandelt. Als Material für Verkalkung brauchbar zeigten sich Glycerol-PhS. Zuckerphosphate einschl. Trehalose, sowie Sphingomyelin, nicht Glycerol-di-PhS und Lecithin. Statt Ca ist auch Sr, Ba und Mg, nicht Li und Be zu verwenden. 60° inaktivirt den gesamten Vorgang, ebenso allerlei Salze, Proteine, Glucose; andere Zucker sind gleichgiltig, ebenso Harnstoff, Glycin, Vitamine und Hormone. NaF hemmt nur den zweiten Mechanismus (0,00001 m), ebenso Jodacetat (0,001 m), KCN unvollständig. Ohne Phosphatasewirkung kann der zweite Mechanismus nicht erfolgen, er ist vielleicht auch enzymatischer Natur. Die calcifizirende Kraft nimmt mit der Dauer einer rachitogenen Kost ab (**373**).

Das Enzym entsteht autochthon in den Osteoblasten selbst. FELL und ROBISON **374**) fanden es in Explantaten von Femur (Hühnerembryonen) im Plasma-Embryonalsaft, ansteigend bis zu einem Maximum der Entwicklung, dann wieder absinkend. Die Embryonen müssen 5—6 Tage alt sein; jüngere bilden keine Ph., und es wuchs nur kleinzelliger Knorpel an. Dasselbe gelingt mit dem Kieferskelett embryonaler Hühner. Das mesodermale Gewebe, das den MECKELschen Knorpel umgibt, bildet bei der in vitro-Kultur Phosphatase und ossifizirt. Der MECKELsche Knorpel, soweit er nicht verknöchert, enthält keine hypertrophischen Zellen und bildet keine Phosphatase.

371) ***R. Robison, A. H. Rosenheim,*** Calcif. of hypertroph. cartil. etc. Biochem. Jl. **28,** 684 (1934). S.A. — 372) ***A. H. Rosenheim.*** Eff. of serum proteins on calcif. Biochem. Jl. **28,** 699 (1934). S.A. — 373) ***A. H. Rosenheim,*** Variabil. in the activ. of calc. mech. etc. Biochem. Jl. **28,** 708 (1934). — 374) ***H. B. Fell, R. Robison,*** Growth, developm. and phosphatase activ. of embryon. avian femora etc. Biochem. Jl. **23,** 767 (1929). **24,** 1905 (1930). S.A.

Es kann aber auch in anderen Geweben zur „Verknöcherung" kommen. Wenn man Harnblasen-Epithel in die Rectus-Scheide der Bauchwand (beide Ph. = 0) einführt, so kann Verknöcherung auftreten; nur dann ist reichlich Ph. nachweisbar (HUGGINS **375**); bestätigt **375a**)). Verknöcherung (in vitro) bei Lunge, Niere, Aorta bei Anwesenheit von PhS-Estern fand ROSENHEIM **376**).

Bei Frakturen steigt der Gehalt an Ph. bis ca. zum 15. Tage an, fällt dann schnell; aber der entsprechende unverletzte Knochen zeigt denselben Anstieg (**377**). Dagegen fand KAMADA **378**) eine „Callus-Phosphatase", die 3—4 Tage nach der Fraktur auftritt, nach 3—4 Wochen maximal ist, und die auf die Frakturstelle selbst beschränkt ist. Nach TIMPE **379**) ist die Ph. des Knochens selbst wenig verändert, die Ph. stammt hauptsächlich aus dem umgebenden neugebildeten Bindegewebe und der mit Bluterguß gefüllten Muskulatur.

Rachitis. Schwierigkeiten bietet in der Deutung die oft angegebene Tatsache, daß auch rachitischer Knochen ebensoviel Ph. enthält wie normaler, oder sogar mehr (z. B. MAI **380**)); POLICARD c.s. (l. c. 366) fanden das Enzym reichlicher als in der Norm und in fast genau derselben Verteilung (Metaphyse etwas reichlicher). FABISCH **381**) fand überhaupt keine verwertbaren Unterschiede bei normalen, rachitischen und nach Vigantol in der Heilung befindlichen Ratten.

Auch bei Hühnern mit „Beinschwäche", einem der Rachitis ähnlichen Zustand, ist Ph. im Knochen vermehrt (SCHECHTER **382**)). Bei Osteogenesis imperfecta (7jähr. Mädchen) fehlte jegliche Ph. im Periost und subperiostalen Gewebe (HANSEN **383**)). Hier ist also im Gegensatz zur Rachitis eine unmittelbare Beziehung zwischen Ph. und Verkalkung zu finden (Serum hatte normalen Ph.-Gehalt.)

Eine direkte Beziehung zwischen Rachitis und Ph. ist also nicht aufzufinden, das spricht gegen die Hypothesen, welche die Rachitis mit einer inaktiven Ablagerung der Ph. in den Knorpeln in Beziehung setzen (KLINKE **383a**)). KAY (l. c. 367) vermutet, daß der hohe Ph.-Gehalt des Blutes bei Rachitis es verschuldet, daß die Knochenbildung nicht genügend Ester zum Zerlegen mehr zugeführt bekommt, weil sie vorher zerstört sind, doch kann das jedenfalls keine ausreichende Erklärung sein. Wahrscheinlich ist die Grundlage der Rachitis in dem „zweiten Prozess" ROBISON's zu suchen, in einer Störung der spezifischen Tätigkeit der Osteoblasten, den Ca-Phosphat-Niederschlag zu bilden, also in einer Funktionsstörung der Zellen selbst, nicht in irgend einer „Ferment-Hemmung".

Auch die Prüfung der Hormone und Vitamine, die mit dem Mineralstoffwechsel und speciell der Rachitis resp. Tetanie zu tun haben, hat nicht viel ergeben. Daß sie in vitro nicht auf die Ph. wirken, ist § 287 gesagt, aber auch Injektionen sagen nicht viel aus. PAGE c. s. **384**), **385**), der zuerst eine Abnahme der Knochenph. bei Fütterung mit bestrahltem Ergosterin gesehen hatte, fand später, daß diese nur auf die toxischen

---

375) ***Ch. B. Huggins***, Phosph. activ. of transplants etc. Biochem. Jl. **25**, 728 (1931). S.A. — 375a) ***E. M. Regen, W. E. Wilkins***, Phosphatase in heterotopic bone form. etc. Jl. of Lab. and Clin. Med. **20**, 250 (1934); BPh **85**, 694. — 376) ***A. H. Rosenheim, R. Robison***, Calcific. in vitro etc. Biochem. Jl. **28**, 712 (1934). — 377) ***R. M. Mc Keown, J. I. Ostergren***, Phosphatase cont. of fract. bone. Proc. Soc. Exp. Biol. **29**, 54 (1931). — 378) ***K. Kamada***, Callus-Phosphatase etc. Fukuoka Jkwad. Zasshi **25**, (1932) (jap.); BPh **67**, 750. — 379) ***O. Timpe***, Physiol. der Knochenbruchheilung. D. Zs. Chir. **241**, 505 (1933); BPh **79**, 89. — 380) ***H. Mai***, Bedeut. der Hexosediph. etc. für die Skelettverkalk. Zs. Kind. **45**, 653 (1928); BPh **47**, 437. — 381) ***W. Fabisch***, Phosphatasegehalt norm. und rachit. Rattenknorpel. Bioch. Zs. **254**, 158 (1932). — 382) ***M. Schechter***, Hexose-diphosphatase bei Hühnern etc. Bioch. Zs. **208**, 443 (1929). — 383) ***A. E. Hansen***, Phosphatase activ.... in osteogen. imperf. Proc. Soc. Exp. Biol. **31**, 1023 (1934); BPh **81**, 657. — 383a) ***K. Klinke***, Mineralstoffw. Hb. der Bioch. Erg. Werk, Bd. III, Jena 1935. — 384) ***L. Baumgartner, E. J. King, J. H. Page***, Abnahme der Knochenphosphatase bei Überfütt. mit bestrahlt. Ergost. Bioch. Zs. **218**, 170 (1929). — 385) ***J. H. Page, D. M. Reside***, Wirkg. von bestr. Ergost. auf Gewebe-Phosphatase. Bioch. Zs. **228**, 171 (1930).

Abgeschlossen: 25. Juni 1935. Ber. Phys. 85, H. 5/6.

Bestrahlungsprodukte zu beziehen ist; ebenso die ausgedehnte Verkalkung von Arterien, Niere etc. Gutes Vigantol hat keine dieser Wirkungen. Analoge Beobachtungen AUSTONI 386), der Verminderungen nach bestrahltem Ergosterin nur dann sah, wenn Entkalkungsprozesse auftreten, und BISCHOFF 387), der diese Abnahme mit einem Präparat fand, in dem nach WINDAUS der antirachitische Faktor zerstört, der toxische „Calcinosefaktor" erhalten war. Injektion von Lymphgewebe-Hormon-(„P-Substanz") bewirkt Zunahme der Ph. bei jungen Ratten im Knochen, Abnahme im Darm (SCHMIDT 388)).

Parathyreoidextrakte injizirt setzen die Knochenph. herab (PAGE 389)), während die Blutph. steigt, nach BODANSKY sehr stark bei Hyperparathyreoidismus (s. u.). Leichte Zunahme der Knochenph. nach Entfernung der Parathyreoidea, Abnahme bei Zufuhr von Parathormon AUSTONI 386). Die Plasmaph. verhielt sich in jedem Falle umgekehrt. Bestrahlung mit Sonnenlicht in 1900 m. Höhe bewirkt Vermehrung der Knochenph. bei normalen Ratten; ebenso Entfernung des sympathischen Grenzstranges auf der operirten Seite (SACCHI 389a)).

§ 293. **Niere** enthält eine kräftige, vielfach untersuchte Phosphatase (s. KAY 390)); sie ist reichlicher in der Rinde als im Mark, noch weniger in der Papille (MORII 391), UMENO 392)) (92 : 70 : 52). Dieses Enzym spielt zweifellos eine wesentliche Rolle bei der Ausscheidung der Phosphate im Harn, die es nach GYÖRGY 393), EICHHOLTZ, ROBISON c. s. 394), 395) und KAY 390) aus den organischen PhS-Estern des Blutes abspaltet. Die isolirte Niere (Herz-Lungen-Präparat) ist nicht mehr im Stande. die anorg. Phosphate des Blutes zu konzentriren, spaltet aber bei der Perfusion zugesetztes Glycerophosphat und scheidet reichlich anorg. Phosphat aus, so daß die Konz. höher ist als im Serum. Ebenso verhält sich am ganzen Tier die Niere nach Ausschaltung der Hypophyse, bei der die anorg. Phosphate im Harn auf ein Minimum absinken (394).

Bei Fischen (*Mustelus*) sind die nachweisbaren Mengen an Enzym dafür zu gering (BODANSKY l. c. 324). Nierenph. spaltet Hefencozymase viel schneller als Knochenph. (MYRBÄCK 396)). Darstellung eines gereinigten Präparates aus Autolysaten mit Essigester und genauere Untersuchung ALBERS 397).

UMENO gibt für den Enzymgehalt der verschiedenen Tiere die Reihenfolge absteigend: Huhn, Katze, Hund, Rind, Kröte, Kaninchen, *Cavia*, während sich bei KAY 390) findet: Katze, Schwein, Kaninchen, *Cavia*, Mensch. Bei Feten praktisch keine, bei Neugeborenen sehr wenig Ph. (BRAIN u. KAY 398)). Bei Erkrankungen der Niere verschiedener Art sinkt der Gehalt, aber am tiefsten (auf $^1/_6$) bei Nephritis mit Tod durch Uraemie, ebenso auch bei experimentell herbeigeführter (BRAIN u. KAY 398); nach UMENO um 30—50 %; die Verminderung ist stärker bei Degeneration der Harnkanälchen, als der Glomeruli (TOMIKAWA 399)).

386) ***B. Austoni c.s.***, Fosfatasi etc. Arch. ital. Chir. **37**, 313 (1934); BPh **83**, 195. — 387) ***G. Bischoff, A. Löschke***, Wirk. der tox. Kompon. des bestrahlt. Ergosterins. Zs. Kind. **52**, 349 (1932); BPh **67**, 602. — 388) ***J. Schmidt***, Glycerophosphatase unter der Einwirkg. der P-Substanz. Zs. Kind. **52**, 676 (1932); BPh **71**, 228. — 389) ***J. H. Page***, Wirkg. des Nebenschilddr.-Hormons auf Phosphatase. Bioch. Zs. **223**, 222 (1930). — 389a) ***U. Sacchi***, Fosfat. dell' osso etc. Atti Soc. Lomb. Chir. **2**, 2081, 2092 (1934); BPh 85, 634. — 390) ***H. D. Kay***, Kidney phosphatase. Biochem. Jl. **20**, 791 (1926). — 391) ***M. Morii***, Phosphatase in der Rinderniere, I—III. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto, C. H. **3** (1932); BPh **72**, 726. — 392) ***M. Umeno***, Phosphatase I, III. Bioch. Zs. **231**, 317, 328 (1931). — 393) ***P. György***, Autol. Abbau organ. P-Verbindg. Bioch. Zs. **161**, 157 (1925). — 394) ***F. Eichholtz, R. Robison, L. Brull***, Hydrol. of phosph. esters by the kidney. Proc. Roy. Soc. B. **99**, 91 (1925) S.A. — 395) ***F. Eichholtz***, Hydrol. organ. Phosph.-Ester. Arch. für exp. Path. **111**; Verh. Pharm. Ges 73 (1926). — 396) ***K. Myrbäck***, Cozymase der Hefe. Zs. phys. Chem. **219**, 173 (1933). — 397) ***H.*** und ***E. Albers***, Nierenphosphatase. Zs. Phys. Chem. **232**, 165 (1935). — 398) ***R. Th Brain, H. D. Kay***, Kidney-phosphatase II. Biochem. Jl. **21**, 1104 (1927) S.A. — 399) ***S. Tomikawa***, Nierenphosphatase bei exper. Nephritis. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto, C, H. **3** (1932) BPh **72**, 727.

Unterbindung der Niere führt zum Schwinden der Ph., nach 16 Tagen (Ratte) gleich Null (KINARD l. c. 323).

Abnahme bei Verfütterung von überbestrahltem toxischem Ergosterin, nicht von gutem Vitamin D (Vigantol) (PAGE 385)). Bei experim. Rachitis und Osteoporosis (junge Ratten) vermindert (SKILL und KAY 400)).

Leber enthält neben den allgemeinen Phosphatasen auch noch die anscheinend spezifische Adenyl-pyro-phosphatase (vgl. §§ 283, 294).

Nach UMENO **401)** ist Leberenzym um die Hälfte schwächer wirksam als Nierenenzym. Reihenfolge absteigend: Huhn, Kaninchen, Hund, *Cavia*, *Bufo vulgaris*. Die Spaltung von Zymophosphat ist auch bei pankreopriven Hunden vorhanden, bei thyreopriven vergrößert (BRUGSCH c. s. **402**)). Bei Avitaminose B unveränderte Ph.-Wirkung, während Phosphorylirung (auch bei anderen Organen) erhöht ist (BODNÁR **403**)). Diese Erhöhung bei anderen Organen (Gehirn, Brustmuskel) fand auch NAGAI **404**), ebenso die unveränderte Spaltwirkung bei Niere und Herz-muskel, aber grade bei Leber eine Verminderung.

Muskel. Die Verhältnisse im Muskel sind auch dann noch verwickelt und nicht einhellig geklärt, wenn wir naturgemäß von den Problemen der endgiltigen Dephosphorylirung der Zucker hier ganz absehen. Zunächst ist sichergestellt, daß der Muskel die specifische Adenyl-pyrophosphatase LOHMANN's enthält, die nur auf diese Adenyl-pyro-PhS hydrolytisch insofern zerlegend wirkt, als freie PhS und Ergadenylsäure entstehen (§§ 283a, 294). Ebenso wird ziemlich allgemein, wie oft betont, angegeben, daß die allgemeine unspecifische Phosphatase im Skelettmuskel praktisch fehlt oder eine ganz geringfügige Wirkung hat, wie neuerdings an verschiedenen Tieren (Glycerol-PhS, Synadenylsäure) von REIS **405**) bestätigt worden ist. Herzmuskel enthält etwas mehr.

Dagegen findet REIS eine specifische Ph. für die Ergadenylsäure, sicher im Herzmuskel (Spaltung im Froschherz 2—4 mal stärker als Synadenylsäure und Glycerol-PhS), ähnlich Hund, Mensch, Schwein, Kaninchen, Huhn; Kalb und Taube zweifelhaft. Das Enzym scheint aber bei Nagern auch im Skelettmuskel vorhanden zu sein.

Andererseits findet sich bei Tumortieren in dem reinen Muskelgewebe ein beträchtlicher Zuwachs an Phosphatase, wenn man Nucleinsäure als Substrat wählt (EDLBACHER **406**), WIENBECK **407**)) (vgl. dazu aber KÖHLER, l. c. 326). Ob es sich hier um ein besonderes Enzym handelt — die Wirkung ist resistent gegen NaF —, etwa um Einschwemmung von Tumorenzym in den Muskel, ist noch unentschieden. Wir kommen auf alle diese Fragen beim Kap. Nucleasen zurück.

Blutgefäße. MACFARLANE, ROBISON c.s. (l. c. 320) untersuchten die Aorta mehrerer Warmblüter im Hinblick auf Zusammenhänge mit patholog. Kalkausscheidungen. Nur bei Ratte fand sich Phosphatase.

Die Trachea enthält bei den meisten Tieren Ph. (l. c. 320).

Milz enthält die beiden Typen (Glycerol-PhS), die bei ph 4,8 und 9,0 wirken, die „saure" Ph. wirkt dreimal stärker auf β als auf α (**408**), wodurch diese Milzphosphatase in strikten Gegensatz zur Ph. der B.K. tritt und sich der einen Ph. der Hefe annähert (ALBERS l. c. 446b).

Leukocyten: bei Kaninchen, im myelo-leukämischen Menschenblut reichlich Ph.

---

400) ***D. J. Skill, H. D. Kay***, Phosphatase of the kidney in exp. osteoporosis. Biochem. Jl. **28**, 1228 (1934); BPh **84**, 55. — 401) ***M. Umeno***, Leberphosphatase. Bioch. Zs. **231**, 324 (1931). — 402) ***Th. Brugsch, H. Horsters***, Phosphatase und Phosphatese. Bioch. Zs. **155**, 459. — 403) ***J. Bodnár, A. Karell***, Phosphoryl. etc. bei B-Avitamin. Bioch. Zs. **230**, 233 (1931). — 404) ***Sh. Nagai***, Phosphatase-etc. Wirkung bei der B-Avitamin. Jl. of Biochem. **16**, 359 (1932) — 405) ***J. Reis***, Nucléotidase etc. Bull. Soc. Chim. Biol. **16**, 385 (1934); BPh **82**, 66. — 406) ***S. Edlbacher, W. Kutscher***, Stoffw. der Tumoren. Zs. phys. Chem. **199**, 200, **207**, 1 (1931/2). — 407) ***J. Wienbeck***, Phosph.-Geh. des Musk. tumorkranker Tiere. Zs. phys. Chem. **219**, 164 (1933). — 408) ***D. R. Davies***, Phosph. act. of spleen extr. Biochem. Jl. **28**, 529 (1934).

(Yonemura 409), Umeno 410)). Dagegen sollen Lymphocyten keine Ph. enthalten (Iwatsuru 411)), soweit sie keine Oxydasereaktion geben.

Erythrocyten. Der niedrige ph der Ph. aus roten B.K. ist schon früher aufgefallen, vgl. Tabelle § 289. Waldschmidt-Leitz c.s. 412) weisen darauf hin, daß die Erythrocyten nur die „saure" Ph. Bamann's (§ 283) enthalten, daß dagegen die alkalische Ph. im Blut nur sehr spärlich ist. Nach W.-L. soll aber überhaupt die saure Ph. aus den roten B.K. stammen, auch die der Organe, so daß diese also ein ganz eigenes Enzym der B.K. ist, und in den Organen nur sekundär vorhanden. Kaninchen enthalten viel mehr Ph. als Ziegen (413).

Die Angabe von Waldschmidt-Leitz, daß diese saure Ph. den roten BK eigen wäre, und daß auch nur diese in den Harn überginge, wird von Bamann (Priv-Mitt.) bestritten, der seine saure Gewebeph. für ein Enzym der Organe selbst hält (l. c. 213). Auch Dmochowski 413a) hält die Ph. der Erythrocyten für verschieden von dem sauren Gewebeferment, da sie im Gegensatz zu dem allgemeinen Gewebeferment durch Mg aktivirbar ist und eine höhere Affinitätskonstante hat. Dementsprechend nimmt er mit Bamann (l. c. 213) an, dass die Ph. des Harns vorwiegend aus anderen Geweben und zwar in der Hauptsache aus der Niere stammt (s.u.).

Phosphoglycerinsäure wird von intakten B.K. nicht gespalten (Barrenscheen 414)), aber nur wegen der Nicht-Permeabilität, denn Hämolysate greifen sie an (Braunstein 415), Schuchardt 416)); dagegen wird Diphosphoglycerinsäure nur ganz wenig, maximal zu 6 % angegriffen (Schuchardt). Es muß daran erinnert werden, daß es sich hier nicht um eine reine Hydrolyse handelt, sondern um Übergang in Brenztraubensäure (§ 286). Der Grad der Spaltung und Umwandlung ist auch bei B.K. derselben Tierart sehr wechselnd. Pyrophosphatase soll in roten B.K. ganz fehlen (Kurata l. c. 199).

Zentralnervensystem. Nach Vondráček 417) enthalten alle Säugetiere Ph.; am meisten Kleinhirn, weniger Großhirn und Rückenmark. Eine Abstufung mit dem P-Gehalt oder dem phylogenetischen Entwicklungsgrad liegt nicht vor. Äußerst geringfügige Wirkung von Großhirn (Rind) fanden Edlbacher c. s. 418). Sie führen diese minimale Wirkung darauf zurück, daß außer in Leber und Niere die Abspaltungen von PhS sich vorwiegend an Kernnucleotiden bei den Kernteilungen abspielen, und solche sind ja in der eigentlichen Gehirnsubstanz nicht gegeben.

Uteruspressaft spaltet nach Hagemann (*l. c. 434a*) Zymophosphat; neuere Angaben dazu habe ich nicht gefunden.

Haut wirkt schwächer als Leber, Niere, Milz. *Cavia* am reichsten (419). Thyreoidea hat nach Forrai (*l. c. 434b*) eine sehr wirksame Ph.

Placenta: nach Horii 420) in der ersten Hälfte der Gravidität (Mensch) mehr „Pyro-", in der zweiten mehr „Ortho-"Ph. In reifen Placenten ist die Pyroph. verschwunden.

---

409) ***S. Yonemura, M. Fujihara,*** Zymophosphatase in Leucocyten (jap.). BPh **36**, 422. — 410) ***M. Umeno,*** Phosphatase V. Bioch. Zs. **231**, 339 (1931). — 411) ***R. Iwatsuru, Y. Minami,*** Phosphatase bei Leukämie. Bioch. Zs. **268**, 394 (1934). — 412) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Nonnenbruch,*** Phosphatasen im Blut u. Harn. Naturw. **1935**, 164. — 413) ***S. Munemura,*** Phosphatasen etc. Jl. of Biochem. **18**, 23 (1933) S.A. — 413a) ***A. Dmochowski, D. Assenhajm,*** Harn- und Blutphosphatase. Naturw. **1935**, 501. — 414) ***H. K. Barrenscheen, H. Beneschowsky,*** Theorie der Glykolyse. Bioch. Zs. **265**, 159 (1933); **276**, 147 (1935). — 415) ***A. E. Braunstein,*** Phosphoglycerase in rot. BK. Bioch. Zs. **272**, 21 (1934). — 416) ***W. Schuchardt, A. Vercellone.*** Verh. von ... Mono- und Diphosphoglyc. geg. Erythrocyten. Bioch. Zs. **272**, 437 (1934); **275**, 261, **276**, 280 (1935) S.A. — 417) ***W. Vondráček,*** Glyceroph. des Zentralnerv. Bioch. Zs. **191**, 88 (1927); Sborn. lek. **29**, 419 (1927); BPh **45**, 392. — 418) ***S. Edlbacher, E. Goldschmidt, V. Schläppi,*** Enz. des Gehirns. Zs. phys. Chem. **227**, 118 (1934). — 419) ***J. Wohlgemuth, Y. Nakamura,*** Verh. der Lip. etc. der Haut. Bioch. Zs. **175**, 216 (224) (1926). — 420) ***J. Horii,*** Pyrophosphatase der Placenta. Arb. III Abt. Anat. Inst. Tokyo C. H. 4; BPh **78**, 126.

Mundschleimhaut (Hund) enthält Ph., die durch Phosphatabspaltung aus organischen Estern des Speichels zur Bildung von Zahnstein beitragen soll (ADAMSON **421**)).
Harnblase positiv (l. c. 320).

Darmschleimhaut enthält eine sehr wirksame — häufig als die wirksamste angegebene — Ph., was zweifellos mit den wichtigen Abbauvorgängen an Phosphatiden und Nucleotiden während der Resorption zusammenhängt.

Sie nimmt nach HEYMANN **422**) von oben nach unten stark ab, aber bei verschiedenen Tieren verschieden, hört bei Ratte schon am Ileum auf, während bei Hund und Kaninchen der ganze Dünndarm sehr wirksam ist.

Abnahme: bei experimenteller Rachitis HEYMANN **422**), bei Darreichung von bestrahltem Ergosterin nur durch die toxischen Bestandteile, reines Vigantol wirkt nicht derartig (PAGE **424**)). HEYMANN **425**) glaubt erwiesen zu haben, daß durch diese Abnahme der Ph. im Darm auch die Spaltung der „organischen Phosphorverbindungen" der Milch im Darm herabgesetzt wird, und daß es Säuglinge gibt, welche diese „Milchphosphate" nicht mehr zerlegen und ausnutzen können; dies soll die Hypophosphatämie bei Rachitis erklären. Dagegen konnte BISCHOFF (l. c. 387) die Abnahme der Darmph. bei rachitischen Ratten überhaupt nicht auffinden. — Nach Injektion von Lymphgewebe-Hormon (P-Substanz) Verminderung (SCHMIDT l. c. 388).

Im Darmsaft (VELLA-Fistel) fand CLEMENTI **426**), **427**) in allen Fällen Ph., sowohl im spontan wie nach mechanischer oder chemischer Reizung abgesonderten. Das F. ist auch im centrifugirten und abgeschwächt im durch Berkefeldfilter gezogenen Saft vorhanden.

Speicheldrüse vorhanden, im Speichel nicht (UMENO **428**)); nur Spaltung von Adenylsäure im Speichel (BORST **429**)). Dagegen enthalten die Sputa von tbc.-Kranken durchweg Ph. und zwar die ohne Bacillen mehr als die bacillenreichen (**430**).

Magenschleimhaut reichlich, Magensaft Null (UMENO); Pankreassaft und Galle reichlich vorhanden (UMENO, GREENE (l. c. 345a)).

Milchdrüse. Adenylsäurespaltung, in der Lactation vermehrt (BORST **429**)).

Milch enthält Ph., die beim Pasteurisiren zerstört wird (GRAHAM u. KAY **431**), **432**)). Optimaler ph = 9.

Tumoren enthalten, wie zuerst FORRAI **433**) fand, eine sehr wirksame Ph., soweit sie epithelialer Natur sind; Fibromyome, Sarkome enthalten nur sehr geringe oder garkeine Ph. Reichlich „Nucleotidase" fanden EDLBACHER c.s. **434**); sie soll resistent gegen NaF sein. (Näh. s. bei Nucleasen). MORII **435**) fand ebenfalls in Carcinom-metastasen reichlich Ph., in Myomen nicht (Glycerol-PhS, Zuckerphosphat).

---

421) ***K. T. Adamson,*** Enzyme act. in the form. of dental calculi, Austral. Jl. Exp. Biol. **6**, 215 (1929); BPh **53**, 405. — 422) ***W. Heymann,*** Lokalis.... einiger Phosphatasen etc. Monschr. Kinderhlk. **48**, 14 (1930); BPh **59**, 485. — 423) ***W. Heymann,*** Phosphatstoffw. bei Rachitis IV, V. Zs. Kind. **49**, 748, 761 (1930). — 424) ***J. H. Page, D. M. Reside,*** Wirk. von bestrahltem Ergosterin etc. Bioch. Zs. **223**, 171 (1930). — 425) ***W. Heymann,*** Organphosphatasen und Milchphosphate etc. Monschr. Kinderhlk. **51**, 390 (1932); BPh **66**, 742. — 426) ***A. Clementi,*** Nuovo ferm. del succo enter., fosfoglicer. Boll. Med. Roma **49**, (1923) S. A., Arch. internat. Phys. **22**, 121 (1923) S.A. — 427) ***A. Clementi,*** Pres. d. fosfoglicerasi nel succo enter. Arch. di Farm. **49**, 341 (1930). — 428) ***M. Umeno,*** Phosphatase in der Galle etc. Bioch. Zs. **231**, 346 (1931). — 429) ***W. Borst,*** Nachweis ... einer Phosphatase in der Milchdr. Zs. phys. Chem. **212**, 126 (1932). — 430) ***Y. Imagawa,*** Phosphatase im Sputum etc. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. **2**, 81; BPh **67**, 377. — 431) ***W. R. Graham, H. D. Kay,*** Phosph. compounds of milk. Jl. of Dairy Res. **5**, 54 (1933) S.A. — 432) ***H. D. Kay, W. R. Graham,*** Eff. of heat on milk phosphatase. Jl. of Dairy Res. **5**, 63 (1933) S.A. — 433) ***E. Forrai,*** Phosph. menschl. Geschwülste. Zs. exp. Med. **43**, 647 (1924); BPh **30**, 391. — 434) ***S. Edlbacher, W. Kutscher,*** Stoffw. der Tumoren. Zs. phys. Chem. **199**, 200, 207, 1 (1931/2). — 435) ***M. Morii, Y. Takabatake,*** Phosphatasen menschl. Uteringeschw. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. **3** (1932); BPh **73**, 243.

Tuberkel (tuberkulöse Lymphome) enthalten nach Angaben japanischer Forscher (MORII 436), HORII 437)) eine Phosphatase besonderer Art und Wirkung, die „T-B-Phosphatase", über die § 285a schon berichtet ist. Sie findet sich am meisten in produktiven, weniger in exsudativen, ganz wenig in sklerotischen und verkästen Herden.

Harn enthält nur sehr geringe Mengen (UMENO **438**) oder (bei Kaninchen) garkeine Ph. (HORII **439**)). Bei Menschen (DMOCHOWSKI **440**)) Nucleoph. und Pyroph. in geringer Menge, große Schwankungen; Ernährung und Arbeit ohne Einfluß. — Nach WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 412) geht nur die saure Ph der Erythrocyten in den Harn über. Auch bei Nephritis nur geringe Wirkung (UMENO, HORII), ebenso Carcinom (DMOCHOWSKI).

Eine genauere Untersuchung der Harn-Ph. hat DMOCHOWSKI (l. c. 413a) vorgenommen. Harn enthält nur die saure Ph., und zwar im Durchschnitt in einer Menge, dass 1 ccm in 1 h etwa 0,1—0,2 mg. P freimacht, häufig aber bis zur 10fachen Menge. Sie ist stark gehemmt; Dialyse erhöht den Gehalt bis auf etwa das dreifache, Fällung nach Dialyse mit Aceton ergibt ein hochwirksames Trockenpräparat, etwa 150 PE/mg. Hemmung durch NaF, Cu und KCN. Mg ist wie bei der sauren Gewebsph. ohne Wirkung, Beste Substratkonz. (Glycerol-PhS) bei etwa 8 %, also schwache Affinität. DM. hält sie für übergetretene Ph. der Niere und schreibt ihr im Harn eine Rolle zu bei der Rückresorption der Zucker in den Nierenkanälchen.

Phosphatasen in Pflanzen. Man wird wohl Ph. überall finden, wenn man Pflanzenteile mit lebhaftem Stoffwechsel (Phosphatide, Nucleinsäuren) untersucht, jedoch ist das vorliegende Material noch nicht sehr groß.

In **Samen** ist Glycerophosphatase bereits 1919 von NĚMEC (*l. c. 430*) gefunden worden, der darauf hinwies, daß sie am reichlichsten in fetthaltigen Samen mit ihrem hohen Phosphatidgehalt vorkommt. NĚMEC **441**) hat dann die Zusammenhänge mit der Keimung untersucht. Bei einigen (Soja, Erbse) steigt die Wirkung, bei anderen (Gerste, Mais) geht sie in den ersten Tagen zurück. — Während der Nachreifung der Gerste geht die Ph. zurück, und damit steigt die Keimfähigkeit. — Auch die Synthese (Soja) ist nachzuweisen. In keimender Gerste hat LÜERS c. s. **442**) die Ph. an verschiedenen Substraten genauer untersucht. Gegenüber dem Phytasegehalt Gehalt an Ph. gering. Während der Keimung Steigerung bis auf das etwa 10fache, Rückgang beim Darren. Auch Pyrophosphate werden zerlegt, besonders reich an Pyroph. sind die Keime (5—6 mal so viel wie Malz).

Blätter: TAPADINHAS **443**) in *Euphorbia pulcherrima.* — Tabakblätter führen Zymophosphat wie Hefe etc. über Triose-PhS in C_3-Körper über (vgl. § 286) (BABA **443a**)). — Ph. in den Blättern der Zuckerrübe und Nachweis von Glucose- und Fructosephosphat in ihnen BURKARD und NEUBERG **444**).

Mikroben. Die Hauptobjekte der Untersuchung waren von Anfang an **Taka** und neuerdings auch **Hefe.** Es ist noch nicht endgiltig geklärt, inwieweit diese beiden Organismen enzymtypisch ähnlich oder verschieden sind. Taka enthält eine ganze Reihe

---

436) ***M. Morii,*** T-B-Pyrophosphatase. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. **2**, BPh **66**, 637, 638, **67**, 376. — 437) ***J. Horii,*** T-B-Phosphatase ebd. C. H. **2**; BPh **67**, 376; H. 4; BPh **78**, 666. — 438) ***M. Umeno,*** Phosphatase III. Bioch. Zs. **231**, 328 (1931). — 439) ***J. Horii c.s.,*** Phosphatolyt. Wirkg. des Kaninchenharns. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. **3** (1932); BPh **72**, 726. — 440) ***A. Dmochowski,*** Phosphatases de l'urine. Soc. Biol. **113**, 956 (1933). 441) ***A. Němec,*** Glyc.-Phosph. Wirkg. von Pflanzensamen etc. Bioch. Zs. **202**, 229 (1928). — 442) ***H. Lüers c.s.,*** Phosphatasen im Malz. Ws. Brau. **46**, 143 (1929) 48, H. 50/1 (1931) S.A. — 443) ***J. Tapadinhas,*** Rech. sur la spéc. de la phosphatase. Soc. Biol. **105**, 811 (1930). — 443a) ***T. Baba,*** Abbau des Hexose-phosphats durch . . . Tabakblätter. Bioch. Zs. **275**, 248 (1935) S.A. — 444) ***J. Burkard, C. Neuberg,*** Entsteh. des Rohrzuckers. ebd. **270**, 225 (1934) S.A.

von Ph., über die schon im Vorangegangenen eingehend berichtet ist, darunter auch die bei extrem saurem ph wirksame (ca. 3), die ganz betont auf Ester sekundärer Alkohole, also auch β-Glycerol-PhS wirken soll. Diese Enzymabart fehlt allen höheren Organismen. Nach den Ergebnissen von SCHÄFFNER (l. c. 303) (**445**) soll sie aber auch der Hefe fehlen. Er fand vielmehr in Glycerol-extrakten von Hefen ein einziges Enzym mit dem opt. ph von 6—7, das eine fast ausschließliche Mono-esterase ist und von den beiden Glycerol-PhS-en nur α spaltet. Auch die Zuckerphosphate, speziell Zymophosphat, greift sie nur sehr langsam an. Neben diesem spezifischen Enzym schien danach die Hefe nur noch die von LÜERS **446)** näher untersuchte Pyroph. zu enthalten.

Nun fanden zwar PETT und WYNNE (l. c. 280a) und HOMMERBERG **446a)** eine energische Spaltung von Zymophosphat durch Trockenhefe und Autolysensäfte, es war aber immerhin möglich, daß diese Spaltung indirekt mit Hilfe des nicht abgetrennten Oxydo-Reduktionsystems erfolgt wäre. ALBERS **446b)** gelang es aber, eine weitere Ph. in Hefe nachzuweisen, die ein ausgesprochenes Desmo-enzym ist. Sie bleibt bei den üblichen Autolysen im Rückstand, auch wenn der größte Teil der Dehydrasen bereits freigelegt ist, und kann durch Verdauung des Rückstandes mit Malz freigelegt werden. Trypsin und Amylase bewirken dasselbe in geringem Maße. Diese zweite Ph. ist im Gegensatz zu der SCHÄFFNERschen sehr stabil und hat ihr Wirkungsoptimum gegen β-Glycerol-PhS und Zymophosphat bei ph unter 4, wie schon PETT c.s. an Autolysensäften fanden. Die SCHÄFFNERsche Ph. ist in diesen Präparaten nicht mehr vorhanden. Mg aktivirt nicht, sondern hemmt. Bei der Dialyse geht ein Aktivator verloren. ALBERS schlägt vor, dieses abweichende Enzym als „Hexose-diphosphatase" zu bezeichnen. Sie schließt sich in der Wirkung an die Milzph. von DAVIES an (l. c. 408), im optimalen ph aber nähert sie sich stark der Takaph. Sie ist in Oberhefen fast 10 mal reichlicher vorhanden als in Unterhefen: 24,6 PE gegen 2,8 PE je g. Naßhefe.

Spaltung von Hexose-Mono-PhS durch *Bact. lactis aerogenes* und *coli* KAGEURA **447)**, von Zymophosphat und Glycerol-PhS durch *Clostridium acetobutylicum* HEARD **448)** (Synthese nicht nachzuweisen). Tuberkelbazillen haben geringfügige Wirkung auf Glycerol-PhS (**449**).

Propionibacterium jensenii (**450), 451)**) enthält eine Ph. mit einem opt. ph von 7.. Auch hier finden wir also die immer wiederkehrende Annäherung der Bakterienfermente an die der tierischen Gewebe, NaF hemmt, Mg aktivirt, ebenso bei *Clostridium acetobutylicum*. (Optimale Mg-Wirkung bei qMg = 2,5, § 289a.) Beide enthalten auch eine Pyrophosphatase (PETT und WYNNE **450)**).

Indessen sind die enzymatischen Verhältnisse, wie häufig bei Bakterien, recht schwankend. Das Propionbakt. enthält nur wenig Pyroph. bei starker Phosphoesterase, *Clostridium* umgekehrt; ersteres spaltet bei Glycerol-PhS $\alpha > \beta$, letzteres $\beta > \alpha$. Auch die opt. ph schwanken je nach dem Substrat und dem Bakterium, z. B. bei Propionbakt. für Hexosediphosphat 5,5—6,0, für Glycerol-PhS und Pyrophosphat 7, bei *Clostridium* etwa umgekehrt. Ein zweifaches ph-Optimum bei 6 und 10 fand bei *B. coli* und *Staph. aureus* BOIVIN **452)** (Spaltung zell-

---

445) ***A. Schäffner, E. Bauer,*** Hefephosphatase. Zs. phys. Chem. **332**, 66 (1935) S.A. — 446) ***H. Lüers, B. v. Zychlinski, Kj. Bengtsson,*** Pyrophosphatase der Hefe. Ws. Brau. **48**, 519 (1931). — 446a) ***Cl. Hommerberg,*** Phosphatase der Hefe. Svensk Kem. Tidskr. **47**, 63 (1935). — 446b) ***H.*** und ***E. Albers,*** Hefenphosphatase, Ark. f. Kemi etc. **12** B. Nr. 3 (1935) S.A. — 447) ***N. Kageura,*** Einw. des Bact. lactis etc. auf Hexosemonoph. Bioch. Zs. **190**, 181 (1927). — 448) ***R. D. Heard, A. M. Wynne,*** Bact. phosphatases. Biochem. Jl. **27**, 1655 (1933). — 449) ***B. Borchi,*** Att. fosfat. del bac. tuberc. Bioch. Ter. Sper. **20**, 411 (1933). — 450) ***L. B. Pett, A. M. Wynne,*** Bact. phosphatases. Biochem. Jl. **27**, 1660 (1933). — 451) ***J. J. Rae, H. D. Kay, E. J. King,*** Recogn. of α- and β-glycerophosphates. Biochem. Jl. **28**, 143 (149) (1934) S.A. — 452) ***A. Boivin, L. Mesrobeanu,*** Comp. chim. des bact. Soc. biol. **112**, 611 (1933).

eigener PhS-Ester). Da bei 10 hauptsächlich die schwer säurelöslichen Ester, bei 7 die leicht säurelöslichen gespalten werden, scheint es sich um Mono-Esterase, resp. Pyrophosphatase zu handeln.

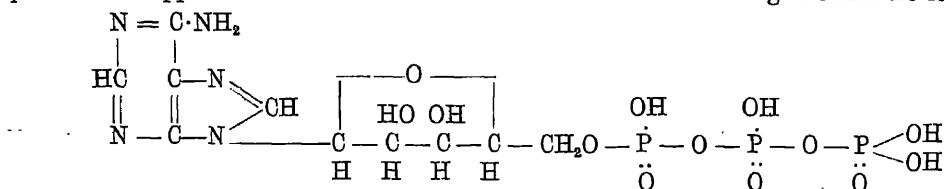
IV. Besondere Phosphatasen.

§ 294. Über die Frage, ob und inwieweit es unter der Gruppe der Ph. Sonderenzyme mit betonter Eigenart und abweichender Spezifität gibt, haben wir § 283 ausführlich gesprochen. Wir sind zu dem Schluß gekommen, daß trotz einiger Verschiedenheiten die Differenzen nicht viel größer sind als bei den Esterasen überhaupt. Wir haben deshalb alle Ph. gemeinsam behandelt. Als Ausnahmen können wir vorläufig nur zwei Enzyme gelten lassen: mit Sicherheit die Phytase, und mit großer Wahrscheinlichkeit die Adenylpyrophosphatase Lohmann's = Adenosin-triphosphatase Barrenscheen's. Die Abtrennung der ersteren ist sowohl in bezug auf ihr ganz spezielles Substrat (Phytin und einige verwandte Stoffe) wie auf die Individualität des Enzyms selbst ohne Weiteres möglich. Schwieriger steht es bei der Adenyl-pyrophosphatase. Hier sind alle wichtigen Fragen noch in Zweifel gehüllt. Es steht weder die Struktur des Substrates widerspruchsfrei fest, noch die Art des biologischen Abbaus, noch die Natur des Enzyms an sich. Außerdem ist es fast unmöglich, die chemischen Zusammenhänge mit den Adenylsäuren einerseits, dem Abbau der Zucker unter Phosphorylirung andererseits zu zerreissen. Ich habe deshalb alle wesentlichen Tatsachen über dieses Enzym bei den allgemeinen Erörterungen (§ 283), bei der Diskussion über die Substrate und die Spezifitätsgrenzen (§ 284), sowie über den Einfluß äußerer Faktoren (§ 289, 289a) im großen Zusammenhang der Phosphatasen mit behandelt. Da es aber doch sehr wahrscheinlich ist, daß es sich wirklich um ein Enzym besonderer Art handelt, so seien die wenigen Tatsachen über das Enzym selbst und sein Substrat hier nochmals wiedergegeben.

1) Adenylpyrophosphatase.

Das Substrat dieses Enzyms ist ein dreifach phosphorylirtes Adenosin, nach Lohmann **453—455)** ein Pyrophosphorsäure-Derivat der Ergadenylsäure; nach Barrenscheen und Filz **456)** enthält es kein Pyrophosphat, sondern an die Adenylsäure 2 PhS anderweitig gebunden, nämlich an die Aminogruppe des Adenins, was Lohmann **(453a, 454)** widerlegt. Nach seinen Befunden und besonders nach den Titrationskurven von Kiessling **457)** muß die Aminogruppe frei sein.

Lohmann hält eine Formulierung genauerer Art über die Feststellung einer Pyrophosphorsäure-Gruppe hinaus für verfrüht und discutirt als nur vorläufige Formel die folgende:

```
 N = C·NH2
 |   |
HC   C—N                ———O———
||   ||   >CH          |  HO OH  |           OH       OH
 N — C—N ————————————— C — C — C — C — CH2O — P — O — P — O — P<OH
                       H   H   H   H          ||       ||       ||  OH
                                              O        O        O
```

453) ***K. Lohmann***, Chem. Natur des Koferm. der Milchs.-Bild. Bioch. Zs. **237**, 445; **241**, 50, 67 (1931). — 453a) ***Ders.***, Konstitut. der Adenylpyrophosphors. ebd. **254**, 381 (1932). — 454) ***K. Lohmann, Ph. Schuster***, Vork. der Adenin-Nucleot. Bioch. Zs. **272**, 24 (1934). — 455) ***K. Lohmann***, Phosphorylirung und Dephosph. Bioch. Zs. **262**, 137 (1933) S.A. — 456) ***H. K. Barrenscheen, W. Filz***, Co-Fermentwirkung. Bioch. Zs. **250**, 281 (1932). — 457) ***W. Kiessling***, Titrat.-Kurven einiger 3-Kohlenstoff-PhS-Ester. Bioch. Zs. **278**, 103 (1935).

SATOH (l. c. 461) versucht sie auf grund seiner enzymtypischen Befunde wie folgt genauer zu präzisiren als Pyrophosphat in 4 der 5 Adenylsäure:

```
                 ┌──────O──────┐
                 │   H     H   │
Adenin — C — C — C — C — CH2·O·PO3H2
             OH   OH   │
                       O
                       │
                  HO2P — O — PO3H2
```

Wie dem auch sei, jedenfalls werden durch Einwirkung eines Enzyms besonderer Art aus diesem Komplex zwei PhS-Reste abgespalten, und zwar als Pyrophosphat (FEINSCHMIDT, l. c. 52a); es verbleibt die einfach phosphorylirte Ergadenylsäure, die nun gegen dies Spezialenzym resistent ist (LOHMANN **453)**, **455)**, JACOBSEN **458)**, BARRENSCHEEN **459)**), während sie durch die allgemeine Phosphatase zerlegt wird. Andererseits sind die gewöhnlichen Substrate sowohl der Phosphoesterase, wie der Pyrophosphatase (anorg. Pyrophosphat) gegen dies Enzym resistent.

Dieses Enzym ist in annähernd reiner Wirkung von JACOBSEN und BARRENSCHEEN aus Leber isolirt worden; es läßt sich von der Phosphoesterase durch Alkoholbehandlung trennen; dieses Präparat greift weder Glycerol-PhS, noch Pyrophosphate an.

Dieses isolirte Enzym hat einen opt. ph von 8,2—9,4, also dasselbe — eigentlich unphysiologische — Optimum wie die Phosphoesterase der Gewebe. Sehr auffallend ist, daß Mg hier nicht aktivirt, sondern schwach hemmt (BARRENSCHEEN).

Dagegen ist über das doch wohl damit identische Enzym des Muskels noch sehr wenig bekannt. Jedenfalls muß es hier beim ph des Muskels selbst wirken, also bei ca. 7. Mg ist hier ohne Einfluß (LOHMANN). Die Phosphatasefrage im Muskel ist ja überhaupt noch sehr unklar, wie wir oft betont haben. Anorganische Pyrophosphate werden nach LOHMANN ohne Mg nicht angegriffen, die Wirkung auf die anderen üblichen Substrate ist auffallend schwach. Zymophosphat wird ohne Mg überhaupt nicht angegriffen, mit Mg nur eine PhS abgespalten, wobei der EMBDEN-Ester entsteht (§ 286).

Die Sache wird dadurch noch weiter komplizirt, daß im Muskel die Bildung und Aufspaltung der Adenyl-pyro-PhS gekoppelt ist mit der Aufspaltung und Bildung von Kreatin-PhS (LOHMANN **460)**). Es ist also bisher nicht möglich, über das Muskelenzym als solches und seine Wirkung rein enzymtypisch betrachtet Endgiltiges auszusagen. Das Enzym aus Herzmuskel hat PARŠIN **460a)** untersucht. NaF hemmt bei > n/20, Jodessigsäure bei n/250 fördert, wenn man Extrakte anwendet; bei der Durchströmung des Herzens selbst mit Adenyl-pyrophosphat ist NaF ohne Einfluß, KCN hemmt etwas.

Im übrigen wird die Sonderexistenz als eigenes spezifisches Enzym neuerdings von SATOH **461)** stark angezweifelt. Er fand, daß von den im Institut von AKAMATSU präparativ getrennten Enzymen (§ 283, 289) sowohl die im sauren wie die im alkal. Gebiet wirksamen Phospho-monoesterasen wie Pyrophosphatasen Adenyl-pyro-PhS angreifen; jedes Enzym für sich und im Gemisch, im letzteren Fall entstand ebensoviel freie PhS, wie mit beiden einzelnen zusammen, so daß also die beiden Einzelf. an verschiedenen Stellen angreifen.

---

458) ***E. Jacobsen,*** Specif. Adenyl-pyrophosphatase. Bioch. Zs. **242,** 292 (1931). — 459) ***H. Barrenscheen, S. Láng,*** Adenosin-triphosphatase. Bioch. Zs. **253,** 395 (1932). — 460) ***K. Lohmann,*** Enzym. Aufspaltg. der Kreatinphosph. Bioch. Zs. **271,** 264 (1934) S.A. — 460a) ***A. Paršin,*** Ferm. Spalt. von Adenosin-triphosph. im Herzmuskel. C. R. Acad. Sci. USSR **3,** 626, 632; BPh **84,** 221. — 461) ***T. Satoh,*** Hydrol. der Adenosin-triphosph. etc. Jl. of Biochem. **21,** 19 (1935) S.A.

Er nimmt deshalb mit LOHMANN gegen BARRENSCHEEN an, daß von den 3 PhS zwei in Pyrophosphatbindung stehen (Formel s. o.). Durch Pyroph. wird zunächst nur die Pyro-PhS aufgespalten, und es entsteht Adenosin-di-PhS. Auf diese ist nun Pyro-phosph. ohne Einfluß, während Phospho-monoesterase in 4 h 70 % der PhS freisetzt. Umgekehrt greift die Monoesterase die Adenyl-pyro-PhS an und ergibt unter Abspaltung der einfach gebundenen PhS in 5 Adenosin-pyro-PhS (die allerdings durch das Präparat gleich zu Inosin-pyro-PhS desaminirt wurde; vielleicht spontan?). Diese war nun gegen Monoesterase resistent, während Pyroph. ohne Weiteres wieder 50 % PhS abspaltet, d. h. Orthophosphat bildet. Die Adenyl-di-PhS ist in 4 und 5 der Ribose substituirt; bei der enzymatischen Zerlegung entsteht ganz vorwiegend 5-Adenylsäure. Eine direkte Zerlegung der Adenyl-pyro-PhS zu 5-Adenylsäure nach BARRENSCHEEN findet also nicht statt.

Bei ph = 8 wurde in Bestätigung von JACOBSEN eine Spaltung durch Leberextrakt weder von Glycerol-PhS noch von Pyrophosphat gefunden, aber von Adenyl-pyro-PhS, so daß also ein specifisches Enzym zu existiren scheint; bei ph = 4 griff aber das Extrakt alle 3 Substrate an. Auch bei ph = 8 ließ sich durch Zusatz von Eierweiß die Wirkung auf Glycerol-PhS und Pyrophosphat aktiviren; diese Enzyme sind also auch vorhanden, aber gehemmt. SATOH folgert daraus also einerseits, daß die spezifische Adenyl-pyro-phosphatase nur ein Gemisch von Pyroph. und Mono-Esterase ist, und zieht daraus ferner den Schluß auf die oben angegebene Struktur der Adenyl-pyro-phosphorsäure.

2) Phytase.

Soweit unsere Kenntnisse und Definitionsmöglichkeiten reichen, ist das Enzym, welches das Phytin zerlegt, ein eigenes unabhängiges Ferment, das hauptsächlich im Malz und sonstigen Samen, aber auch in *Aspergillus* etc. vorkommt. (Hauptw. § 294). Phytin ist der Hexa-Phosphorsäureester des inaktiven Inosits, des Hexa-oxy-cyclohexans $C_6H_6(OH)_6$, ein in Pflanzen weit verbreiteter Reservestoff.

Methode der Herstellung von Phytase und Bestimmung der Wirksamkeit bei LÜERS, Hauptw. Bd. III, S. 756.

Die Spezifität der Phytase ist erneut von HORIUCHI **462)** betont worden. Gereinigte Taka-Phosphatase hatte Wirkung weder auf Phytin noch auf Inosit-mono-PhS. Von tierischen Organen spaltet kräftig nur Niere, ferner noch Muskel — der ja die übliche Phosphatase kaum enthält —, wenig Leber und Knochen; diese Angaben stehen zu den älteren von MAC COLLUM (*l. c. 463*) in vollem Gegensatz.

Der **opt. ph** war bei Phytase aus Reiskleie und Niere = 4,3 bei Phytin; bei Inosit-mono-PhS dagegen Reiskleie 5,6, Niere 3,1. Die Phytase von *Aspergillus Oryzae* und *Mycoderma* hat einen opt. ph = 4,4 (SHIMODA **463)**). Malzphytase nach LÜERS **464)** scharfes Optimum bei 5,2—5,3.

Nach LÜERS läßt sich die Reakt. Geschw. bis zu einer gewissen Grenze der Enzymkonz. durch die Formel der SCHÜTZschen Regel $K = \frac{x}{\sqrt{t}}$ ausdrücken. Temp. Opt. scharf bei 48°. Phosphate hemmen stark (Affin.-Konst. = $2{,}18 \times 10^{-4}$). Inosit hemmt nicht. Mit zunehmender Substratkonz. nimmt die Reakt.-Geschw. relativ ab. Sehr empfindlich gegen Temp., bei 60° Inaktiv.-Koeff. = 28,7.

Nach SHIMODA **463)** fehlt Phytase in allen echten Hefen; er fand sie außer in *Asp. oryzae* nur noch in *Pichia farinosa* und *Mycoderma A Takahashi*.

---

462) ***K. Horiuchi,*** Phytase etc. Jl. of Biochem. **14,** 163 (1931). — 463) ***K. Shimoda,*** Occurr. of phytase in some yeasts etc. Zbl. Bakt. (2), **71,** 232 (1927). — 464) ***H. Lüers, K. Silbereisen,*** Phytase des Malzes. Woch. Brau. **1927,** 263.

E. Sulfatasen.

§ 295. Die Fermentgruppe der Sulfatasen, deren Entdeckung durch C. NEUBERG **465)** wir im H.W., S. 523, grade noch mitteilen konnten, hat eine wesentlich größere Bedeutung, als es zunächst den Anschein hatte. Es gibt nicht nur die zuerst beobachtete Untergruppe der S., welche die Ester der Schwefelsäure mit Phenolen (Aetherschwefelsäuren) spaltet, sondern noch weitere Untergruppen.

NEUBERG und SIMON **466)** unterscheiden bis jetzt 3 Arten von Sulfatasen.

1) die bisher allein bekannte, welche die Schwefelsäureester an phenolischen Hydroxylen verschiedenster Art spaltet: Phenosulfatase;

2) Chondrosulfatase, welche die Schwefelsäureester von Kohlenhydraten in den komplexen Schwefelsäuren der Glykoproteide, Chondroitinschwefelsäure u. Ä. zerlegt; ob sie mit der einfache Zuckersulfate zerlegenden Glykosulfatase SODA's identisch ist, ist noch nicht klar. Wir werden sie vorläufig zusammen behandeln.

3) das Teilenzym des Myrosins (Thioglucosid-Sulfatase, Myro-Sulfatase), welches aus den komplexen Thioglykosiden die am Sauerstoff der Senfölgruppe haftende Schwefelsäuregruppe abspaltet. Über die Konstitution dieser Stoffe s. H. W. § 364. Die Wirkung dieses Teilenzyms ist also mit der Gesamtwirkung des Myrosins, d. h. also mit der Wirkung der spezifischen Thioglykosidasen eng verknüpft, so daß wir diese Sulfatase im Wesentlichen erst beim Kap. Thioglykosidasen (§ 363) mit behandeln werden.

Über Gewinnung der Fermentpräparate, Herstellung der Substrate etc. s. NEUBERG und SIMON, Hauptw. Bd. III, 760. Diese Darstellung ist auf die Phenosulfatase beschränkt, da die anderen Sulfatasen erst später bekannt wurden.

I. Phenosulfatase.

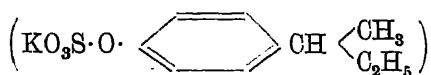
Qualitativer Nachweis des Enzyms durch Freisetzung von H_2SO_4 und Prüfung in essigsaurer Lösung mit Ba-Acetat oder Benzidin-HCl. Bei Anwendung von Indoxylschwefelsaurem Kalium Oxydation des Indoxyls zu blauem Indigo (H.W., Bd. III, S. 762). — Reinigung durch Extraktion des trockenen Organs mit NH_3, Dialyse etc. (HOMMERBERG **467)**).

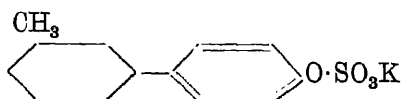
Zerlegt werden ausschließlich aromatische Ester, auch des β-Naphtols (H.W. S. 523), sowie halogenirter und Nitrophenole; alle aliphatischen und alicyclischen (z. B. Äthyl- und Amylschwefelsäure) sind resistent, auch des Borneols, Methylcyclohexanols, und das Sulfat der Mandelsäure (NEUBERG und WAGNER **468)**). Wohl aber sind einige heterocyclische Ester zerlegbar (o-Oxychinolin, Indoxyl).

---

465) ***C. Neuberg,*** Ü. das neue Ferment Sulfatase. Naturw. **1924,** 797. — 466) ***C. Neuberg, E. Simon,*** Sulfatasen etc. Erg. Phys. **84,** 896 (1932). — 467) ***Cl. Hommerberg,*** Tier. Phosphatase und Sulfatase. Zs. phys. Chem. **200,** 69 (1931). — 468) ***C. Neuberg, J. Wagner,*** Sulfatase VII. Bioch. Zs. **161,** 492 (1925). — 469) ***Cl. Fromageot,*** Sulfatase XI, Stereoch. Spez. Bioch. Zs. **208,** 482 (1929).

Asymmetrische Spaltung erzielte (mit Taka und Schweineleber) FROMAGEOT 469) am p-sec.-Butylphenol-Ester

$$\left(KO_3S\cdot O\cdot C_6H_4\cdot CH\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}\right)$$

es wurde das rechtsdrehende Phenol erhalten; Höchstwert + 13,3°. Der unzersetzt gebliebene Anteil drehte nach Hydrolyse durch Kochen links. Dagegen wird m-Methylcyclohexyl-phenol-Ester

$$CH_3\text{-}C_6H_{10}\text{-}C_6H_4\text{-}O\cdot SO_3K$$

symmetrisch gespalten (WEINMANN 470)).

Der opt. ph liegt etwa beim Neutralpunkt, Pufferung mit festem $CaCO_3$ als Bodenkörper (HOMMERBERG 467). Nach FUJITA 471) soll bei Taka der opt. ph bei 9 liegen. Phosphate hemmen, anscheinend auch Mg (HOMMERBERG).

Vorkommen: Sehr reichlich in Taka (*Aspergillus Oryzae*); in allen tierischen Geweben (472).

Reihenfolge der Spaltung nach 18 Tagen absteigend (473): Niere, Gehirn, Leber, Duodenum, Nebenniere, Milz, Lunge, Muskel, Dünndarm, Pankreas. In der Haut WOHLGEMUTH c. s. 474). Dagegen hat YOSHIMATSU 475) das Enzym (Phenolschwefels. K) vermißt in Magen, Darm, sowie Glycerinextrakten von Leber, Niere und Pankreas. Die Niere enthält Phosphatase/Sulfatase 0,41, Gehirn 0,36 (Schwein) (HOMMERBERG).

II. Chondrosulfatase, Glucosulfatase.

Dieses Enzym, das die KH-Komplexe der Chondroitinschwefelsäure u. ä. zerlegt, ist von NEUBERG und HOFMANN 476) ausschließlich in einigen Bakterien gefunden worden (*B. proteus, pyocyaneus* und einem dem *B. fluorescens non liquefaciens* verwandten). Das Enzym greift auch die Estergruppe in den Thioglucosiden (Kaliummyronat) an, nicht aber die Phenol-SchS. Die Enzymwirkung beschränkt sich nicht auf die quantitative Ablösung der Schwefelsäure, sondern spaltet auch noch den eigentlichen Kohlenhydrat-Komplex zu reduzirenden Zuckern auf.

Chondroitin-SchS., Bestandteil aller Knorpel, auch in den Wänden der großen Arterien, im Amyloid etc. ist ein noch nicht völlig aufgeklärter Komplex. Er baut sich auf aus 2-Chondrosamin (2 Amino-talose, LEVENE) und 1 d-Glucuronsäure, die zusammen Chondrosin bilden. Dieses ist am N des Aminozuckers acetylirt, an den beiden CH_2OH-Gruppen derselben Zucker sulfurirt. Diese Bindung wird durch die Chondrosulfatase gespalten, also eine Zucker-SchS. Dasselbe Enzym spaltet auch die Mucoitinschwefelsäure, die weit verbreitet in vielen tierischen Geweben, besonders in den Schleimsubstanzen vorkommt und als Aminozucker 2-Aminoglucose, Glucosamin, enthält; ferner auch Sulfatide des Gehirns, die Schwefelsäure-Ester des Cerebrons an seiner Galactose-gruppe sind (477).

---

470) ***F. Weinmann***, Sulfatase X. Bioch. Zs. **205**, 214 (1929). — 471) ***Sh. Fujita c.s.***, Sulfatase. Arb. III Abt. Anat. Inst. Kyoto C. H. **4**, 130 (1933); BPh **77**, 323. — 472) ***C. Neuberg, E. Simon***, Sulfatase V. Bioch. Zs. **156**, 365 (1925). — 473) ***L. Rosenfeld***, Sulfatase in menschl. Organen (Sulfatase VI). Bioch. Zs. **157**, 434 (1925). — 474) ***J. Wohlgemuth, Y. Nakamura***, Lipase etc. der Haut. Bioch. Zs. **175**, 216 (1926). — 475) ***G. Yoshimatsu***, Verh. der Aethyl- und Phenolschwef. gegen Organextr. Act. Schol. Med. Kyoto **11**, 649 (1929); BPh **50**, 791. — 476) ***C. Neuberg, E. Hofmann***, Chondrosulfatase. Naturw. **1931**, 484. Bioch. Zs. **234**, 345 (1931) S.A. — 477) ***C. Neuberg, W. Cahill***, Enzym. Abbau von Mucoitinschwefelsäure. Bioch. Zs. **275**, 328 (1935) S.A.

Das Enzym ließ sich aus dem Trockenpräparat der Bakterien mit Toluolwasser extrahiren und durch Alkohol-Äther fällen. Spaltet bei ph = 7 Chondroitin-SchS-Na zu 94 % in 2 Tagen auf. MIYAZAKI 478) hat Chondrosulfatase in *B. pyocyaneus* nicht finden können, es wird keine Schwefelsäure frei, nur reduzirendes Kohlenhydrat.

Ein Zucker-SchS-Ester spaltendes Enzym fand in Autolysaten japanischer Schnecken (*Viviparus, Eulota, Charonia*) (Leber) SODA 479). Es spaltet Glucose- und Galaktose-Sulfat, und sollte als Glykosulfatase von der Chondrosulfatase verschieden sein. Demgegenüber steht nun aber die positive Angabe von TANKÓ 480) aus dem NEUBERGschen Institut, daß die Bakterien-Sulfatase ebenfalls Glucose- und Saccharose-SchS zerlegt. SODA 481) hält aber in neueren Arbeiten daran fest, daß zwar alle möglichen ein- und mehrwertigen Ester von Zuckern, auch Mannit (schwach) spaltbar sind, aber unspaltbar (neben Äthylsulfat, Monoacetonglucosesulfat, Stärkesulfat) grade eben Chondroitin-SchS. Bei weitem am schnellsten wird Glucose-6-SchS gespalten, dann das Sulfat des α-Methyl-glucosids.

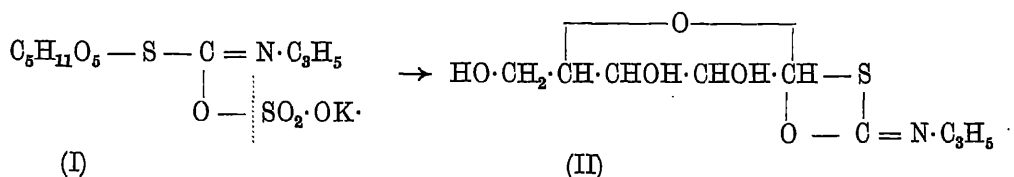
Bei den Gastropoden mit kräftiger Enzymwirkung scheinen biologische Substrate des Enzyms (z. B. im Schleim) vorzukommen, da Hydrolyse organischen Schwefel in anorg. überführt (SODA). Bei den Pelecypoden ist die Enzymwirkung viel schwächer. Am stärksten wirken *Charonia* (Leber) und *Bursa bufo*.

Reinigung des Enzyms auf elffache Wirkung durch $BaCl_2$ und $Al(OH)_3$, die es nicht adsorbiren, so daß man damit Begleitstoffe entfernen kann. Spaltprodukte (Glucose und anorg. Sulfate), auch anorg. Phosphate hemmen.

III. Myro-sulfatase.

Die Auffindung dieses neuen Enzyms wurde durch die Beobachtung von NEUBERG und WAGNER 482), 483) herbeigeführt, daß zwar tierische Organe Sinigrin etc. sulfatatisch zerlegen, nicht aber die Sulfatase aus Taka, die eben nur das Phenolaether zerlegende Ferment enthält. Ebenso ist umgekehrt Myrosin ohne Wirkung auf Phenolschwefelsäuren. NEUBERG nennt das neue Enzym Myro-Sulfatase.

Dieses Teilenzym des Myrosins bewirkt natürlich nicht die volle Aufspaltung, oder die Lösung der Thioglucosebindung, es wirkt vielmehr im Molekül des Sinigrins nur „sulfatatisch", d. h. es spaltet nur die SO_3H-Gruppe am Senfölrest ab (I):

$$\underset{(I)}{C_6H_{11}O_5-S-\underset{\displaystyle O-\vdots SO_2\cdot OK\cdot}{\overset{|}{C}}=N\cdot C_3H_5} \;\rightarrow\; \underset{(II)}{HO\cdot CH_2\cdot\overbrace{CH\cdot CHOH\cdot CHOH\cdot CH}^{O}-S \quad \underset{O\,-\,C=N\cdot C_3H_5}{\vert\quad\quad\vert}}$$

Dabei würde also das Mero-sinigrin (II) entstehen, das aber bei Vorhandensein der eigentlichen Thio-glykosidase durch Lösung der glykosidischen Bindung Thioglucose und Senföl liefert (§ 363).

478) ***T. Miyazaki***, Ferm. of chondroitinsulf.-acid etc. Jl. of Biochem. **20**, 287 (1934); BPh **84**, 141. — 479) ***T. Soda, Ch. Hattori***, Gluco-Sulfatase. Proc. Imp. Ac. Tokyo **7**, 269 (1931); Bull. Ch. Soc. Japan **6**, 258 (1931). — 480) ***B. Tankó***, Spalt. der Glykose-Schwefels. etc. durch Bakt.-Sulfatase. Bioch. Zs. **247**, 486 (1932). — 481) ***T. Soda c.s.***, Glucosulfatase, Jl. of Ch. Soc. Jap. **54**, 59; Bull. Ch. Soc. Japan **8**, 65, 148, 207, **9**, 83 (1933/4). — 482) ***C. Neuberg, J. Wagner***, Verschied. der Sulfatase u. Myrosinase. Bioch. Zs. **174**, 457 (1926). 483) ***C. Neuberg, J. Wagner***, Zerleg. des myrons. Kaliums d. animal. Sulfatase. Zs. exp. Med. **56**, 334 (1927) S.A.

Am wirksamsten erwies sich Leber (in 3 Tagen 50 % Spaltung von Sinigrin), weniger Muskel (in 10 Tagen 13 %). Andererseits zeigte sich, daß beim klassischen „Myrosin" selbst starke Verschiebungen insofern auftraten, als bei 100 %iger Abspaltung der Schwefelsäure erst 66 % des Thioglucosids gespalten waren (SANDBERG 484)).

Optimaler ph: EULER c. s. 485) hatten ihn wegen der entstehenden freien Schwefelsäure nicht genauer feststellen können. SANDBERG 484) gelang es ziemlich exakt durch Anwendung sehr verdünnter Lösungen, so daß die freie Säure nur wenig stört. Das Opt. ist recht breit, 5,4—7,4.

Eine noch nicht quantitative, aber recht weitgehende präparative Trennung der Thioglucosid-Sulfatase und Thioglucosidase ist NEUBERG c. s. 486) gelungen, so daß in den Präparaten erst nach 24 h sich noch Anzeichen von Thioglucosidase geltend machen.

Die Trennung gelingt durch Adsorption der Thioglucosidase, wobei sich Kaolin, Eisenhydroxyd, Osmosil und verschiedene Tonerden bewährt haben. In der Restlösung mit Kaolin sind z. B. noch 100 : 20 Sulfatase zu Thioglucosidase, noch wirksamer $Fe(OH)_3$. Sulfatase kann durch Hg-Acetat oder Bleiphosphat niedergeschlagen und wieder herausgelöst werden, z. B. mit verschiedenen Na-Phosphaten. Auf diese Weise kann z. B. durch mehrfache Fällung mit Hg-Acetat und Elution mit $Na_2HPO_4 + NH_3$ reine Sulfatase erhalten werden.

Das Enzym kommt außer im Myrosin nur im Tierkörper vor, Pilze, auch Taka, enthalten es nicht.

Nachtrag bei der Revision:

Zu S. 123. Es ist S. 122 und 123 bereits ganz kurz auf die Entdeckung einer besonderen Kinase bei der gegenseitigen Umlagerung der PhS-Ester der Glucosen und Fructosen hingewiesen worden. Dieser Befund ist aber so wichtig, daß wir ihn in diesem Nachtrag ein wenig genauer mitteilen müssen. Durch diese Entdeckung hat die bisher ziemlich unklare enzymatische Spaltung des Zymophosphats ein anderes Gesicht bekommen, und darüber hinaus gibt diese Entdeckung neue Gesichtspunkte für das Entstehen der biologischen Estergemische beim Zuckerabbau. B. TANKÓ u. R. ROBISON 487) stellten fest, daß hochgereinigte Phosphatase aus Knochen das Zymophosphat glatt in etwa gleiche Mengen der bereits bekannten am-Fructose-6-PhS und der von ROBISON (l. c. 144) beschriebenen Fructose-1-PhS spaltet. Aldose-PhS tritt in diesem Falle nicht auf. Wenn man aber rohes Enzym anwendet oder ein Alkohol-Äther-Trockenpräparat aus Rohenzym, so tritt die partielle Umlagerung zu Aldose-PhS auf. Das Rohenzym enthält eine Kinase, die bei der Reinigung zerstört wird, so z.B. schon durch Stehenlassen mit wäss. Alkohol. Die Autoren nennen sie **Phospho-hexokinase**. Sie findet sich auch im Knochenmark und ist wahrscheinlich identisch mit der von LOHMANN in Muskel, Organen und Hefe gefundenen Kinase. Sie hat keine Wirkung weder auf freie Fructose, noch auf n-Fructose-1-PhS. Wohl aber bildet sie sowohl aus der am-Fructose-6-PhS wie aus der Glucose-6-PhS ein Gleichgewicht beider Formen. So entstehen also die Gleichgewichte bei der enzymatischen Spaltung von Zymophosphat wie überhaupt beim Abbau der Zucker, wie wir sie beschrieben haben, und wie sie vor Allem im EMBDEN-Ester auftreten.

Aus der Arbeit sei weiter erwähnt, daß die Reindarstellung der n-Fructose-1-PhS gelang, und daß bei der Säurespaltung des Zymophosphats noch weitere linksdrehende Fructose-PhS-en entstehen, wahrscheinlich mit Bindung der PhS an anderen Stellen.

Zu S. 160/1. Zu der Entwicklung des Mechanismus der Calcification liegen noch zwei weitere Mitteilungen von ROBISON c.s. vor, die im Text nicht mehr berücksichtigt werden konnten. Bei Kaninchen 488) tritt die Verkalkung des hypertrophischen Knorpels und osteoiden Gewebes in vivo sehr bald nach ihrer Bildung bei den Embryonen auf. Längere rachitogene Diät scheint den calcific. Mechanismus zu schwächen. Beide Mechanismen werden weder durch Trocknung noch durch Acetonbehandlung der Gewebe vernichtet. Die andere Arbeit (489) enthält weitere Untersuchungen über den Zeitpunkt des Auftretens des calcif. Mechanismus bei embryonalen Geflügel-knochen. In den frühesten Stadien der Entwicklung ist er noch nicht vorhanden, tritt z.B. bei langen Knochen erst am 15. Tage der Bebrütung auf.

---

484) ***M. Sandberg, O. M. Holly,*** Myrosin. Jl. of Biol. Chem. **96,** 443 (1932). — 485) ***H. v. Euler, S. E. Eriksson.*** Enzym. Spalt. des Sinigrins. Ferm. Forschg. 8, 519 (1926) — 486) ***C. Neuberg, O. v. Schönebeck,*** Aufteilung der Myrosinase. Naturw. **1933,** 404; Bioch. Zs. **265,** 223 (1933) S.A. — 487) ***B. Tankó, R. Robison,*** Hydrol. of hexosediph. ester by bone phosphatase. Biochem. Jl. 29, 961 (1935). S.A. — 488) ***J. S. F. Niven, R. Robison,*** Developm. of the calcif. mech. in the long bones of the rabbit. Biochem. Jl. **28,** 2237 (1934). S.A. — 489) ***H. B. Fell, R. Robison,*** Developm. of the calcif. mech. in avian cartil. ebd. **28,** 2243 (1934). S.A.

VIII. Hauptteil.

Carbohydrasen I.

A. Allgemeines.

§ 296. Allgemeine Abgrenzung. Dieser Hauptteil faßt unter dem Namen Carbohydrasen sämtliche Enzyme zusammen, deren Wirkung die Spaltung aller Stoffe ist, die ganz oder teilweise aus **Kohlenhydraten** bestehen. Die Darstellung in diesem Kapitel hat in einem sehr wichtigen Punkte an Einheitlichkeit gewonnen. Wir können heute sicher sagen, daß der Angriffspunkt aller Carbo-hydrasen eine Aethergruppe, also eine Anhydridbildung zwischen zwei alkoholischen, oder einem alkoholischen und einem phenolischen Hydroxyl ist. Da immer mindestens eine dieser Gruppen einem Zucker angehört, so ist eine **glykosidische Bindung** vorhanden, und man könnte die ganze Gruppe auch Glykosidasen nennen, wenn sich diese Bezeichnung nicht bereits für eine Gruppe von Fermenten eingeführt hätte, welche die Glykoside im engeren Sinne zerlegen, nämlich solche Stoffe, die einen Nicht-Zuckerrest, ein **Aglucon** oder Genin enthalten, meist ein Phenol (auch Anthranol, Flavonol etc.), Stoffe vom Typus des Salicins. Nach den Vorschlägen französischer Forscher, besonders von BRIDEL, faßt man alle durch Anhydridbildung (Ätherbildung) an Zuckern entstandenen Stoffe, die also hier als Substrate der Carbohydrasen zu betrachten sind, zusammen als **Glykoside**, und unterscheidet nun als Untergruppen die **Holoside**, deren sämtliche Teilgruppen Zucker sind, und die **Heteroside**, die neben Zuckern eben ein Aglucon enthalten.

Der große Fortschritt ist nun darin zu finden, daß wir heute, nach den gesicherten Erkenntnissen des Aufbaus der höheren Kohlenhydrate nicht mehr zuckerartiger Natur (§§ 365 ff.), mit Bestimmtheit sagen können, daß auch diese Stoffe Glykoside, und zwar natürlich Holoside sind, und daß auch die verschiedenen Enzyme, welche sie zerlegen, nichts anderes sind als „Glykosidasen", d. h. daß sie auch nichts anderes tun, als Ätherbindungen in den langen Ketten der Polyosen zu zerlegen, und daß ihre Spezifität eben in der Affinität zu diesen langen Ketten beruht. Neben vielen anderen Gründen spricht für die Einheitlichkeit aller Carbohydrasen eben grade der Umstand, daß es gewisse Übergangsstufen der Kettenlänge gibt, bei denen beide Hauptuntergruppen wirken, die auf die kurzen Ketten und die auf die langen Ketten eingestellten Enzyme (vgl. GRASSMANN, § 383); so wirkt auf das Abbauprodukt der Cellulose mit noch 6 Glucoseresten, die Cellohexaose, sowohl die Cellulase, wie die Cellobiase.

Zwar sind bei den wichtigsten Enzymen dieser Gruppe, den Stärke spaltenden Amylasen, die Dinge noch nicht klar zu durchschauen; denn es gibt zwei Amylasen, die beide auf Stärke selbst und auf Dextrine einwirken, sowie noch ein

drittes davon trennbares Enzym, das nur genuine Stärke angreift, Dextrine nicht (WALDSCHMIDT-LEITZ). Die specifischen Eigentümlichkeiten aller dieser Teilenzyme sind solange nicht aufzuklären, so lange der Stärkeaufbau noch grundsätzliche Rätsel aufgibt (§ 366); aber trotzdem ist auch hier nicht zu bezweifeln, daß alle Enzyme, die auf Stärke wirken, Glykosidbindungen lösen, mithin im Haupt-Gruppenmerkmal alle derselben Hauptreihe angehören. Auch das „dritte Enzym" setzt bereits reducirende Gruppen frei. Meine frühere Annahme, daß es neben den Glykosidasen noch Enzyme anderer Art gäbe, die nur durch Lösung von Nebenvalenzbindungen das kolloide Aggregat auflösen, desaggregirende Fermente, ist hier wie bei den Proteasen anscheinend nicht mehr notwendig.

I. Einteilung und Benennung.

§ 297. Da durch die modernen Forschungen alle Zweifel über den grundsätzlichen Bau der Substrate der Carbohydrasen geschwunden sind, so kann man nun auch für die gesamten Carbohydrasen eine straffe Einteilung nach dem bekannten Nomenklaturprinzip aufstellen. Dabei wollen wir vorläufig die vielen zweifelhaften Einzelheiten betr. die Specifität dieser so gewonnenen Untergruppen ganz zurückstellen, da wir uns damit eingehend beschäftigen müssen (§ 299). Ebenso wie im Kap. Esterasen stellt sich uns das Problem gegenüber, ob und inwieweit Wirkungsverschiebungen auf die Existenz ganz verschiedener Enzymsysteme oder auf relative Specifitäten, also auf bevorzugte Wirkung eines und desselben Fermentes auf eine Substratgruppe mit schwächerer und allmählich versagender Wirkung auf eine ähnliche Substratgruppe zu beziehen sind. In dieser Beziehung sehen wir auch in manchen wichtigen Fallen durchaus noch nicht klar. Es ist also möglich, daß die fortschreitende Klärung es herbeiführen wird, daß einige der hier aufgestellten Enzymgruppen zusammengelegt werden oder neue Untergruppen aufgestellt werden müssen.

Zwei große Gruppen bieten sich von selbst dar: die Spezifität der Fermente, welche die Polysaccharide oder Polyosen zerlegen, ist im Allgemeinen als gesichert zu betrachten. Den von WEIDENHAGEN 1) 2), angezweifelten Grenzfall des Inulins, das vielleicht durch die normale Saccharase zerlegt wird, wollen wir bei Seite stellen, da Inulin an sich durch seinen relativ einfachen Aufbau an der Grenze der Polyosen steht, und zweifellos noch einfachere Polylaevane von Saccharase zerlegt werden (§ 308).

Es steht also nichts im Wege, diese Enzymgruppe wieder wie im H. W. S. 525 als **Polyasen** zu bezeichnen. Diese Gruppe umfaßt dann also alle Enzyme, welche die nicht mehr süß schmeckenden, langkettigen, halb- oder ganz kolloiden Kohlenhydrate in einfachere Zucker zerlegen. Folgende Untergruppen lassen sich bisher differenziren:

Fructanasen, welche die Fructane, die aus Fructofuranose aufgebauten Polyasen zerlegen: Inulinasen.

β-Glucanasen, enthaltend die eigentliche Cellulase, die dieser zum mindestens sehr nahestehende Lichenase und weitere mit dieser wohl identische Enzyme, die mit der Cellulose rein struktur-chemisch identische, aber im Bau etwas abweichende,

---

1) *R. Weidenhagen*, Spez. u. Wirk. der Carbohydrasen, Erg. Enzymf. I, 168, Leipzig 1932. — 2) *R. Weidenhagen*, Carbohydrasen, Hb. der Bioch. Erg. Werk, Bd I, Jena 1933.

hauptsächlich wohl kürzerkettige β-Glucane zerlegen; diese Stoffe wurden bisher unter dem Verlegenheitsbegriff der Hemicellulosen mit untergebracht, die dazu gehörigen Enzyme als Hemicellulasen oder Cytasen bezeichnet. Am besten läßt man alle diese Bezeichnungen überhaupt fallen, und benennt den einen Teil dieser „Hemicellulasen" wie vorgeschlagen als β-Glucanasen, den anderen Teil nach ihren Substraten als Mannanasen, Galactanasen und Pentosanasen (Xylanasen, Arabanasen).

Weitere Polyasen z. T. komplexer Natur sind die Pektinasen und die Agar-Agar, einen Polyose-Schwefelsäureester zerlegende wenig erforschte Gelase, vielleicht noch einige andere Enzyme. Anschließend daran die Chitinase, die auf Derivate des N-Acetyl-glucosamins eingestellt ist (auch auf niedermolekulare wie Glykoside (§ 343)).

Es bleibt dann noch die wichtigste Untergruppe der Polyasen, nämlich die der Amylasen, die Stärke, Glykogen und deren höhere Abbauprodukte (Dextrine) bis auf die Maltose-Stufe hydrolysiren. Sie ist wie erwähnt nicht einheitlich, besteht aus α- und β-Amylase, ohne daß damit ausgedrückt werden soll, daß die eine auf α-glykosidische, die andere auf β-glykosidische Bindung eingestellt ist. Immerhin sind aber die Fragen des Aufbaus der Stärke noch so unklar, daß wir nicht berechtigt sind, sie einfach als ein α-Glucan den β-Glucanen entgegenzustellen; wir müssen die Fermente vorläufig eben einfach noch Amylasen benennen. Dazu kommt dann noch das als solches bisher wenig bekannte „dritte Enzym" von WALDSCHMIDT-LEITZ. Dem Begriff Polyasen läßt sich leider noch nicht ein ebenso einfacher auf dem Substratnamen aufgebauter Begriff für die anderen Enzyme gegenüberstellen. Wir hatten im H.W. S. 525 vorläufig den von v. EULER vorgeschlagenen Namen Hexosidasen acceptirt, weil er vortrefflich die Hauptgruppen deckt, nämlich die Enzyme, welche Glykoside von Hexosen spalten. Aber principiell ist er zu eng, er deckt weder die Spaltung von Pentose-Glykosiden, noch die von Biose-Glykosiden (zwischen Biose und Aglukon).

Nun hat GRASSMANN 3) kürzlich den m. W. zuerst von HELFERICH vorgeschlagenen Namen Oligosaccharide als Gegenpol der Polysaccharide acceptirt, welcher die kristallisirten höheren Zucker umfaßt, von denen Vertreter jetzt etwa bis zu den Hexaosen bekannt geworden sind; die diese zerlegenden Enzyme nennt er demgemäß Oligosaccharasen. Die tragende Idee dieser Scheidung ist ausgezeichnet; ich möchte mir aber gestatten, auch hier wie bei den Polyosen die unmißverständliche Kürzung in Oligosen vorzuschlagen, und demgemäß nunmehr alle Enzyme, welche die Glykosidbindung in kurzen Ketten lösen, als **Oligasen** neu zu bezeichnen. Diese Hauptuntergruppe der Oligasen kann man dann weiter teilen, wenn man die Nomenclatur der französischen Forscher zugrunde legt und alle Glykoside, die nur aus Zuckern bestehen, Holoside, die mit Agluconen dagegen Heteroside nennt. Dann kommt man wieder zu einer (nur principiellen, s.u.) Teilung der Enzyme in **Holosidasen** und **Heterosidasen**. Dann kann man unter Beibehaltung des Begriffes Glykoside als „Verbindungen, die einen süssen Stoff" enthalten (*glykýs* = süß) weiter nach Art der Zucker teilen, also in Glucoside, Fructoside, Galactoside, Mannoside, Riboside, Arabinoside, Rhamnoside etc., von denen jeweilig das betr. Enzym mit der Endung . . . ase gebildet wird, soweit nicht die Specifitäten zusammenfallen, wie bei Galactosiden und Arabinosiden, Xylosiden und Glucosiden. Die in der Natur vorkommenden Rhamnoside

---

3) ***W. Grassmann, L. Zechmeister c.s.,*** Zur Specif. polysaccharidspalt. Enz. Naturwiss. **1932**, 639.

Abgeschlossen: 15. 8. 35. Ber. Phys. 86, H. 5/6.

gelten bisher als enzymatisch unspaltbar; bei Phenol-l-rhamnosid hat HELFERICH eine sehr schwache Spaltung durch Emulsin beobachtet.

Will man ganz systematisch vorgehen, so kann man, um jeden Zweifel auszuschliessen, noch Hologlucosidasen von Heteroglucosidasen trennen, was gerade in diesem Falle nicht unzweckmässig ist, da damit das wahrscheinlich spezifische Enzym, das β-Phenolglucoside spaltet (im „Emulsin") getrennt wird von den β-Glucosidasen, die β-Glucoside aus Zuckern (Cellobiose, Gentiobiose etc.) zerlegen; denn diese sind eben wahrscheinlich andere Enzyme (§ 333 ff.). Inwieweit diese Gruppe der β-Heteroglucosidasen mehrere von einander verschiedene, auf natürliche β-Glucoside wirkende Enzyme enthält, bleibt dabei offen (§ 337); es ist aber unwahrscheinlich.

Auf eine besondere Schwierigkeit in der Teilung zwischen Holosidasen und Heterosidasen muß dabei gleich hingewiesen werden. Während wir bei den β-Glucosidasen — trotz einiger Widersprüche — wohl daran festhalten können, daß eben Cellobiase von der β-Phenolglucosidase verschieden ist, so ist es demgegenüber sehr viel wahrscheinlicher, daß alle α-Glucosidasen gruppenidentisch sind. Die „Maltase" spaltet auch alle synthetischen α-Glucoside, vom Methyl an, und α-Phenolglucosid sogar besonders leicht; andererseits kommen wieder seltsame Besonderheiten bei „Maltasen" verschiedenen Ursprungs vor, die grade für die Theorie der relativen Spezifität von größter Bedeutung geworden sind (§ 299). Bei den Galactosidasen scheint in beiden Reihen eine Trennung in Holosidasen und Heterosidasen nicht möglich zu sein. Ein Vorkommen beider Arten getrennt scheint es somit nur bei den β-Glucosidasen zu geben. Vielleicht hängt dies damit zusammen, daß es nur hier biologische Substrate in beiden Reihen gibt: es gibt keine natürlichen α-Heteroglucoside und wohl auch keine Heterogalactoside. Es läßt sich also eine Trennung in Heterosidasen und Holosidasen nur principiell aufrecht erhalten. In unserem System selbst werden wir sie nur bei den β-Glucosidasen benutzen; dazu kommen dann noch einige anscheinend selbständige Heterosidasen, die Heteroside besonderer Art zerlegen (§ 361).

§ 298. System der Carbohydrasen. Für die Systematik sind noch zwei Momente wichtig, die aus dem H.W. S. 526 zu reproduciren sind. Erstens geht durch die ganze Reihe der Carbohydrasen hindurch das sterische Prinzip. Fermente, welche die β-Konfiguration an der Glykosidbindung lösen, sind stets und unwidersprochen verschieden von denen, welche die α-Konfiguration angreifen, hier herrscht strenge Specifität (§ 299): die Konfiguration am C-Atom 1 ist also absolut entscheidend für die Affinität zur einen oder anderen Gruppe, so daß man α-Fermente und β-Fermente nach wie vor völlig trennen kann. Für die systematische Benennung der Holosidasen muß weiterhin noch angegeben werden, zu welchem Teil des Holosid-Moleküles das betr. Enzym die spezifische Affinität hat. Sind die Zucker verschieden, so genügt die Nennung des betr. Zuckers. So ist die Lactase eine β-Galactosidase, da ihre Affinität nicht an der Glucose, sondern an der Galactose der Lactose ansetzt, Melibiase eine α-Galactosidase. Beide Biosen sind Galactosido-glucosen, d. h. die C_1-Gruppe der Galactose ist veräthert, die der Glucose frei. Es scheinen prinzipiell die wichtigsten Enzyme die Affinität zur Glykosidgruppe, nicht zum freien Zucker zu haben, so daß nur dort, wo beide Zucker nicht frei sind, zwei verschiedene Affinitäten von zwei verschiedenen Enzymen ausgeübt werden. Das ist der Fall bei der Saccharose (Fructosido-glucosid): die übliche Saccharase (Invertase) ist eine Fructosidase; es gibt aber noch ein Enzym, das Saccharose an der α-Glucosidogruppe angreift, die Glucosaccharase, deren Identität oder Nicht-Identität mit der Maltase heute noch umstritten ist. Auch die gewöhnliche Maltase (Hefe) hat eine Affinität zur glykosidisch gebundenen Glucose; sie spaltet auch α-Methylglucosid etc. Ob es daneben

eine zweite Maltase gibt, die an der freien Glucosegruppe ansetzt, eine „Glucomaltase", ist heute noch nicht sichergestellt; es soll die tierische Maltase und die der Samen sein, da diese α-Methylglucosid nicht angreifen. Ähnliche, noch weniger geklärte Möglichkeiten liegen bei der Lactase („Glucolactase") und bei Gentiobiase-Amygdalase vor.

Es ergibt sich somit nach dem heutigen Stand der Erkenntnis folgendes System:

CARBOHYDRASEN

A. **Oligasen.**

I. Holosidasen.

1) Fructosidasen: Fructosaccharase (Saccharase schlechthin, Invertase); spaltet auch Raffinose, Gentianose, Stachyose unter Freisetzung einer Fructose.
2) α-Glucosidasen: Maltasen, Glucosaccharase, Trehalase. (Spaltung von Melecitose, Turanose).
3) β-Glucosidasen: Cellobiase (Gentiobiase, Amygdalase), Isomaltase (?), Glucolactase (?); hierzu noch Scillarenase, Digipurpidase u. ä. (§ 342a).
4) α-Mannosidase: (natürliche Substrate bisher nicht sicher bekannt).
5) α-Galactosidasen: Melibiase (Galactoraffinase).
6) β-Galactosidasen: Lactase. Anhang: Manninotriase, Rhamninorhamnase.

II. Heterosidasen.

1) Hetero-β-glucosidasen (β-Phenolglucosidase, Prunase des Emulsins). Diese Gruppe spaltet β-Glucose ab aus Heterosiden mit β-Glucose allein oder mit Biosen verschiedener Art, wenn die Aglucon-Bindung an einer Glucose erfolgt; sie ist sehr wahrscheinlich — abgesehen von inneren Verschiedenheiten je nach der Herkunft — einheitlicher Natur. Alle besonders bezeichneten Enzyme sind wohl mit der Hetero-β-glucosidase gruppenidentisch, so Rhamnodiastase, Indimulsin, Erythrozym, Isatase, Gease u. a.
2) Hetero-biosidasen, spalten aus natürlichen oder synthetischen Glykosiden Biosen verschiedener Natur an der Aglucon-bindung ab. Die Sonderexistenz dieser wenig untersuchten Gruppe ist zweifelhaft. Hierzu Rhamninase, β-Maltosidase (PETERSEN l. c. 19).
3) Pentosidasen. Hier ist genauer bekannt nur die Gruppe der
   a) Nucleosidasen, welche die Riboside der Purine zerlegen, einschl. der vielleicht davon verschiedenen Enzyme, welche die Nucleoside der Thymo-nucleinsäure mit dem Zucker Thyminose = Desoxy-ribose spalten.
   b) Rhamnosidasen und weitere sehr wenig bekannte Enzyme, welche die Aglucon-bindung an anderen Pentosen, wie z. B. Digitoxose, Cymarose spalten. — Isorhamnosidasen, Xylosidasen und Arabinosidasen gibt es als eigene Enzyme nicht; sie sind mit den Glucosidasen resp. Galactosidasen identisch (HELFERICH).
4) Glucuronidasen, spalten Glykoside der d-Glucuronsäure.
5) Thioglucosidasen (Myrosin), spalten Glykoside der Thioglucose (Glucothiose).

B. **Polyasen.**

I. Amylasen.
II. Fructanasen: Inulinasen.
III. β-Glucanasen: Cellulasen incl. Lichenase.
IV. Hemicellulasen: Galactanasen, Mannanasen, Xylanasen, Arabanasen. — Anhang: Gelase.
V. Pektinasen. — VI. Chitinasen.

II. Spezifität der Wirkung.

§ 299. Die Probleme der Spezifität der Oligasen, die wir im H.W. als in großen Linien zur Ruhe gekommen betrachten durften, sind seitdem zwar in einigen damals noch unklaren Fragen bereinigt, aber leider sind die wichtigsten Fragen heute wieder unklarer als je; es stehen entscheidende Punkte in nicht beendeten Diskussionen.

Es ist immer wieder dieselbe Grundfrage, die zwar generell gelöst ist, aber doch in den einzelnen Punkten immer wieder von neuem aufgeworfen wird, und immer wieder mit neuen Argumenten geprüft werden muß: ob für die Erklärung verschiedenartiger Wirkungen auch verschiedene Enzyme angenommen werden müssen, oder ob die an sich zweifellos giltigen Prinzipien der relativen Spezifität, wie sie von WILLSTÄTTER und KUHN 4) 5) entwickelt worden sind, auch für die im Mittelpunkt der Diskussion stehenden Differenzen ausreichen. Eine Zeitlang schien es, als ob durch die Anwendung dieses Prinzips allmählich eine ziemlich weitgehende Beschränkung zunächst der Holosidasen auf einige wenige Enzymtypen Platz greifen würde, nachdem WILLSTÄTTER und KUHN das alte Problem der verschiedenartigen Wirkung der Hefenmaltase und der tierischen Maltase auf synthetische α-Glucoside nicht durch zwei verschiedene Enzyme in verschiedener Mischung (nämlich neben der Maltase eine besondere α-Glucosidase) gedeutet hatten, sondern durch verschiedene Maltasetypen mit wechselnder relativer Affinität; und nachdem sie ebenfalls auf grund des gleichen Prinzips die Sonderexistenz von Raffinasen und anderer besonderer Trisaccharasen weggeräumt hatten (H.W. S. 529). Indessen kam nach dieser Entwicklung eine andere Strömung auf, deren Führer wieder neue Enzyme aufstellten.

Es sei davon abgesehen, daß die endgiltige Verschiedenheit von Lactase und Melibiase erkannt wurde. Denn dies war die selbstverständliche Folge der Strukturaufklärung der Melibiose, die sich als eine α-Galactosido-glucose herausstellte, so daß das Enzym Melibiase ohne Schwierigkeit einen so gut wie leeren Platz einnahm; denn die Existenz von α-Galactosidasen war zwar durch BOURQUELOT aus Hefen bekannt (H.W. S. 538), aber sie waren kaum untersucht und nicht mit der Melibiase gleichgesetzt worden, da man die Melibiose für ein β-Holosid hielt.

Im übrigen entstand mit der Aufklärung der systematischen Stellung der Melibiase sofort wieder eine neue Schwierigkeit in der Aufklärung ihrer Beziehungen zu einem ebenfalls Melibiose, aber nur in der gebundenen Form als Bestandteil der Raffinose spaltenden Enzym, der z. B. im Mandel-emulsin beobachteten Galacto-raffinase. Diese Enzyme sind sich sehr ähnlich, aber wieder doch nicht völlig wesensgleich. Es scheint dies überall aufzutreten, wenn eine Biose nicht mehr in freier Form, sondern an eine dritte Hexose gebunden ist, es treten dann immer, also bei den Trisacchariden, irgend welche Anomalien auf, die es zur Folge haben, daß die alte Frage, ob es für die Trisaccharide besondere Enzyme gibt, niemals völlig zur Ruhe kommt; und ganz ähnliche Probleme stellen sich dar, wenn die dritte Gruppe ein Aglucon ist, wenn sich also Biosen ihrerseits noch glykosidisch an einen Nicht-zucker binden. Endlich werfen gewisse Absonderlichkeiten die Frage auf, ob nicht grundsätzlich die freien Biosen anders gegen Fermente reagiren, als dieselben in glykosidischer Bindung an ein Aglucon.

Wir stehen somit vor einer Fülle von Problemen über die Grenzen der Spezifität der einzelnen Enzyme und immer wieder vor der Frage, ob wir in den einzelnen Fällen

---

4) ***R. Willstätter, R. Kuhn,*** Üb. Spezif. der Enzyme. Zs. phys. Chem. **125**, 28 (1923). — 5) ***R. Willstätter, R. Kuhn, H. Sobotka,*** Üb. die rel. Spezif. der Hefemaltase. Zs. phys. Chem. **134**, 224 (1924).

gesonderte Abarten der betr. Enzymgruppe annehmen sollen oder nur veränderte relative Spezifitäten, bedingt nur durch quantitative Abwandlungen der Affinität. So ist denn das Gebiet der Oligasen in dieser Beziehung noch recht unklar.

Diese Schwierigkeiten der zunächst rein systematischen Abgrenzung der Substratspezifität addiren sich nun zu den anderen bekannten Schwierigkeiten in der Abgrenzung zwischen den einzelnen Enzymabarten, so daß wir hier im Ganzen auf noch weit komplizirtere Verhältnisse treffen als bei den Phosphatasen oder gar den Lipasen. Bei den Lipasen waren wir wenigstens der Schwierigkeit einer Abgrenzung nach den Substraten überhoben, bei den Phosphatasen bekamen wir schon einen Vorgeschmack, sobald wir einmal zugestehen mußten, daß es möglicherweise für verschiedene Arten von Estern der PhS. verschiedene Arten von Phosphatasen gibt, und bei den Oligasen stoßen wir darauf auf Schritt und Tritt. Nun fanden wir aber weiter bei Lipasen wie Phosphatasen, daß es Enzyme gleicher Wirkung, aber von deutlich verschiedenem äußerem Verhalten, verschiedene „isodyname" Fermente gibt; dies scheint nun bei den Oligasen häufiger als bisher sicher festgestellt vorzukommen; dieser Umstand verwirrt das Bild weiter und verwirrt es um so mehr, als es den Anschein hat, als ob die Abwandlungen, welche das Fermentsystem erfährt, um seine äußeren Eigenschaften zu verschieben, durchaus nicht immer dabei Halt zu machen scheinen, sondern auch die Kernfrage, nämlich die Substrat-spezifität gelegentlich anzutasten scheinen, so daß Übergangsformen auftreten mit verschwommener Affinität zu bestimmten Hexose-gruppen; man muß manchmal gradezu an eine doppelte Spezifität denken, mit wechselnder Betonung mal der einen, mal der anderen, mal der zur Glucose, mal der zur am-Fructose.

Es erscheint mir nicht ausgeschlossen, daß z. B. das bisher völlig unklare Problem des Vorkommens einer besonderen Glucosaccharase (Spaltung von Saccharose durch Affinität zur Glucose-gruppe) darin eine „Lösung" finden wird, eine Lösung zwar, die keine wäre, uns vielmehr ziemlich hilflos auf die Grundfragen zurückwerfen würde, denn vorläufig ist ja die Substratspezifität noch der einzige schwache Strohhalm, an den wir uns bei einer Einteilung der Fermente halten können. So sei hier erwähnt, daß Kuhn 6), 7) die Glucosaccharase in der Hauptsache dadurch gekennzeichnet hat, daß sie Raffinose nicht an der Fructose-gruppe angreifen, d. h. überhaupt nicht angreifen kann, wenn nicht vorher Melibiase gewirkt hat, und in zweiter Linie dadurch, daß sie von Glucose, nicht von Fructose gehemmt wird (s. u.). Als Hauptsitz dieses Enzyms gilt die Taka von *Aspergillus oryzae*. Nun fand aber Kuhn selbst gelegentlich Spaltung von Raffinose dort, und Weidenhagen 7a) hat diese Spaltung dort regelmäßig gefunden. Er nimmt also eine Fructosaccharase an, analog der klassischen Invertase der Hefen; aber diese hat nun erheblich veränderte Eigenschaften; sie wird z. B. trotz sogar betonter Raffinose-spaltung durch Glucose gehemmt. Auch alle anderen Vorkommnisse dieser Glucosaccharase sind vorläufig in Zweifel gehüllt, die wohl nicht nur auf die mangelhafte experimentelle Durchforschung dieses Gebietes zurückzuführen sind; es finden sich vielmehr in beinahe allen Schimmelpilzen solche unklaren Saccharasen, mit verschobenem opt. ph, abweichenden Hemmungserscheinungen etc. (§ 312). Diese Fragen und so manche andere sind durchaus noch nicht zu durchschauen.

Ein ähnlicher Fall betrifft die Auffindung zweier verschiedener β-Galactosidasen durch Helferich (§ 332) in den Samen von Mandeln resp. Luzerne, die sich zunächst äußerlich unterscheiden. Es ist aber noch garnicht sicher, ob hier nicht auch Spezifitätsverschiebungen

---

6) ***R. Kuhn,*** Vergleich von Hefe- und Takasacchar. Zs. phys. Chem. **129,** 57 (1923). — 7) ***R. Kuhn, G. E. v. Grundherr,*** Konst. der Melecitose. Ber. Chem. Ges. **59,** 1655 (1926). S.A. — 7a) ***R. Weidenhagen c.s.,*** Taka-saccharase I, II. Zs. V. D. Zuck. **78,** 125, 242 (1928). S.A.

mitspielen; vielleicht hat die der Mandeln eine Affinität gleichzeitig auch zur β-Glucose, die der Luzerne nicht. Ähnlichen Fällen werden wir im Spez. Teil auf Schritt und Tritt begegnen.

Diese Erscheinungen summieren sich also zu der beinahe selbstverständlichen und bei fast allen Fermenten beobachteten Erscheinung, daß die Enzyme verschiedener Herkunft etwas verschieden in der Art sind; man denke nur an die äußerlich so abweichende Art der verschiedenen Lipasen. Aber bei den Oligasen und ganz besonders denen der Mikroben scheint noch ein erheblich erschwerendes Moment hinzuzukommen, nämlich die Inkonstanz der enzymatischen Reaktionen bei denselben Zellarten unter verschiedenen Bedingungen, z. B. bei verschiedener Ernährung. Auch dafür werden wir überall, besonders z. B. § 312, Belege finden. Diese Verschiebungen erstrecken sich auf alle Möglichkeiten: Produktion bestimmter Enzyme überhaupt (sog. adaptative Fermentbildung), äußerliche Reaktionen des Enzyms (ph etc.) und auf die erwähnten verschwommenen Affinitäten, so daß man nicht mehr recht sagen kann, was für eine Enzymabart vorliegt. Dadurch werden die Verhältnisse überaus schwierig, und man kann bei der versuchten Systematisirung immer nur mit einer gewissen Willkür vorgehen und sich durch Hinweis auf die vorhandenen Unklarheiten salviren. Unter diesen Vorbehalten wollen wir nun unter Verweisung auf Einzelheiten im Speziellen Teil die Entwicklung der Hauptfragen der Spezifität kurz schildern.

Wie gesagt, kreuzen sich zwei Strömungen: die eine will die Anzahl der Einzelenzyme dadurch herabsetzen, daß sie nur wenige strenge Prinzipien der Spezifität zuläßt; ihr Wortführer ist insbesondere WEIDENHAGEN, ferner in gewissem Sinne HELFERICH (§ 300). Eine andere will zwar nicht grade neue Enzyme, aber doch neue Typen schaffen, wobei wir auf die so oft betonte Unmöglichkeit, zwischen diesen Aussagen eine scharfe Trennungslinie zu ziehen, hier nicht wieder zurückkommen wollen. Diese Bewegung war vorbereitet grade durch die zuerst erfolgte Vereinigung von „Maltase" und „α-Glucosidase"; Vereinigung in dem Sinne, daß es nicht etwa zwei ganz verschiedene Enzyme gibt, von denen das eine nur Maltose, das andere nur synthetische α-Glucoside spaltet, sondern daß beide Wirkungen einer Maltase zugehörig sind. Daraus ergab sich aber dann eben zwangsläufig, daß es sozusagen zwei verschiedene Maltasen gibt, die zwar beide Maltose als Hauptsubstrat spalten, von denen aber die eine auch Hetero-α-Glucoside zerlegt, die andere nicht. Das erwuchs gradezu aus dem Prinzip der relativen Spezifität, und wenn es sich dabei auch nicht um völlig neue Enzymarten handelt, verschieden wie Maltase und Cellobiase, so handelt es sich um neue Typen, um neue Enzymabarten, wie sie GRASSMANN (l. c. 3) nennt, Abarten der Enzymklasse Maltase. Wie sich dies bei dem Begriff „Maltase" im Einzelnen auswirkte, werden wir gleich ersehen.

Zuvor wollen wir uns aber mit der Frage der **Glucosaccharase** befassen, da diese viel tiefer in die Hauptprobleme hinabreicht und infolgedessen viel größere Unruhe in prinzipieller Hinsicht hervorgerufen hat. Wir konnten die ersten Beobachtungen von RICH. KUHN 6) im Hauptwerk (S. 542, 567) noch grade berücksichtigen. Er gab an, daß es zwei Typen von Saccharase gibt, die Saccharose in ganz verschiedener Weise angreifen, aber mit demselben Ergebnis der Zerlegung in Glucose und Fructose. Es handelt sich also um zwei sozusagen „isodyname" Fermente im Endeffekt, aber nicht im Mechanismus. Denn die eine greift durch Affinität an der Fructosegruppe an, ist eine Fructosidase, die andere an der Glucosegruppe, ist also eine Glucosidase. Die Fructosidase ist repräsentiert durch die klassische Invertase der Hefen; die Glucosaccharase fand KUHN in der Takasaccharase von *Asp. oryzae*, sie kommt aber wohl auch in anderen Schimmelpilzen vor, und auch die Saccharase der tierischen Organe

scheint eine Glucosacch. zu sein. KUHN erschloß diese Verschiedenheit zunächst aus Hemmungs-erscheinungen, was sich aber bald als unbefriedigend herausstellte (s. u.). Wichtiger zeigte sich die Aufdeckung verschiedener Substrat-spezifitäten, wenn man nämlich Substrate prüft, in denen entweder die Glucose- oder die Fructose-gruppe weiter durch Substitution verändert ist. Da die Fructosidase ihre betonte Affinität zur Fructosido-gruppe hat, so kann diese Affinität aufgehoben werden, wenn man die Fructose verändert; und umgekehrt bei der Glucosidase.

Fur solche Untersuchungen sind in erster Linie Trisaccharide brauchbar (KUHN c. s. 7), 8)). Melecitose ist ein System bestehend aus Glucose-Fructose-Glucose; bei der Abspaltung einer Glucose entsteht die Biose Turanose. Raffinose ist dagegen ein System Fructose-Glucose-Galactose (Näh. und Formeln §§ 308, 321). Nun greift Hefen-invertase Melecitose nicht an, weil die Affinität zur Fructose-gruppe durch deren Substitution mit einer weiteren Glucose verändert ist; Glucosaccharase aber greift Raffinose nicht an, weil hier der Glucose-rest verändert ist.

Hierfür genügt meist schon die Einführung einer Phosphorsäure in die Glucose: Saccharose-PhS. (Hesperonal) wird durch Hefeninvertase stets, durch Taka meist nicht angegriffen; jedoch kommen hier Ausnahmen vor, vielleicht weil das Präparat nicht einheitlich ist und auch an der Fructose PhS. gebunden enthält (§ 308). Glucosacch. spaltet die Melecitose zunächst in Glucose und Turanose, deren weitere enzymatische Spaltung zweifelhaft ist (§§ 300, 308).

Diese Affinitäten sind also theoretisch wenigstens absolute Spezifitäten, wenn die eine Gruppe durch Substitutionen soweit verändert wird, daß das betr. Ferment eben gar keine Affinität mehr zu dieser nunmehr veränderten Gruppe besitzt. Dies ist also der Fall bei Raffinose gegen Gluco-, bei Melecitose gegen Fructo-saccharasen.

Dagegen kommen wir durch die Messungen von R. KUHN 8) und v. EULER 9), 10) zu einem näheren Verständnis der relativen Spezifität dieser Enzymabarten, wenn wir ihre Affinitäten zu den unveränderten Zuckern in den Biosen selbst betrachten. Man kommt bei genauerer Prüfung der Hemmungserscheinungen zur Erkenntnis dieser Affinitäten. Die erste Messung, daß Fructose die Fructosaccharase hemmt, α-Glucose die Glucosaccharase (H.W. § 308), erwies sich als zu primitiv. Denn es hat nach v. EULER auch Hefensaccharase Affinität zur Glucose — als „β-Enzym" mehr zur β- als zur α-Glucose —; aber die zur Fructose (β-am-Fructose des Rohrzuckers) ist viel schärfer und strenger, die zur Glucose ist eher eine allgemeine „Zuckerspecifität" (v. EULER), nicht viel anders als die zur Galactose oder zu Zuckerphosphaten. Z. B. zeigten v. EULER und JOSEPHSON 10), daß die specifische Hemmung der Fructosaccharase durch Fructose beim Zusatz von Galactose nicht beeinflußt wird, wohl aber die Hemmung durch Glucose, da in diesem Falle eben Glucose und Galactose in folge etwa gleicher Affinität um das von der Saccharose abgedrängte Enzym konkurriren. So erwuchs aus diesen Beobachtungen die „Zweiaffinitäts-Theorie'' v. EULER's, auf die wir hier im Einzelnen nicht eingehen können (vgl. JOSEPHSON 11)).

Es sei hier nur vorausgeschickt, daß R. KUHN 8) die Hemmung durch Glucose bei Saccharase nicht durch Affinitätshemmung (kompetitive Hemmung) erklärt, sondern

---

8) ***R. Kuhn, H. Münch,*** Gluco- und Fructosacch. Zs. phys. Chem. **150,** 220 (1925), **163,** 1 (1926). — 9) ***H. v. Euler,*** Die zw. Substrat und Enz. besteh. Affin. etc. Zs. phys. Chem. **143,** 79 (1925). — 10) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Hemm. Ersch. bei der enz. Rohrz.-Spalt. Zs. phys. Chem. **152,** 31 (1926). — 11) ***K. Josephson,*** Theorie der Spezifität der Ferm. Hb. der Bioch. Erg. W. Bd. I, Jena 1933.

durch eine sozusagen unspecifische Hemmung (Näh. § 308); er lehnt deshalb die „Zweiaffinitäts-Theorie" ab. Ebenso kann hier nur darauf hingewiesen werden, daß nach WEIDENHAGEN 12) die auf Grund des Massengesetzes berechneten specifischen Affinitäten keine wesenswichtige innere Bedeutung haben, da man wahrscheinlich richtiger anstatt mit dem Massengesetz mit Adsorptionsvorstellungen arbeitet, also mit den Normen der mikroheterogenen Katalyse, deren Ableitungen formal zu denselben Gesetzen führen, wie bereits HITCHCOCK 13) gefunden hat.

Immerhin muß das Eine noch hier vermerkt werden, daß nach WEIDENHAGEN's eigener Ansicht (l. c. 26) die verschiedenartige Hemmung der Hefensaccharase und der — nach ihm ebenfalls Fructoside spaltenden Takasaccharase — bisher nicht zu deuten sind, wenn nicht eben doch die Takasacch. eine Glucosaccharase ist. Denn seine eigenen Messungen bestätigen die echte Affinitäts-hemmung der Hefensacch. durch Fructose, während diese auf Takasacch. überhaupt nicht wirkt. Und Takasacch. wird durch α-Glucose durch echte Affinitätshemmung beeinflußt. Seine Deutung, daß hier „scheinbare" Affinität durch Begleitstoffe vorgetäuscht wird, ist eine nicht zu beweisende Behauptung, die für ihn deshalb Beweiskraft hat, weil er eben die Identität als Fructosidasen für beide Sacch. als erwiesen ansieht.

Sind also die theoretischen Fundamente für die Unterscheidung zweier Saccharasen nach ihren besonderen Affinitäten noch nicht sehr feste, so steht es mit der experimentellen Sicherung der Existenz dieser beiden Typen nicht viel besser. Wenn sich das Schema: Hefe = Angriff von Raffinose = Fructosacch., Taka = Nicht-angriff von Raffinose = Glucosacch. in allen Fällen bestätigen ließe, dann wäre es schön und gut; aber dieses Schema stimmt nicht exakt. Wir haben schon erwähnt, daß KUHN selbst und dann WEIDENHAGEN (l. c. 7a) Raffinosespaltung auch in der Taka gefunden haben; SCHLUBACH (l. c. 79) fand Spaltung beider Methylfructofuranoside in der Taka. Umgekehrt fanden KUHN (l. c. 7) und später BRIDEL (l. c. 32) gelegentlich in echten Hefen auch Angriff von Melecitose. Die Untersuchung verwandter Mikroben hat bisher ganz unsichere Ergebnisse gehabt (§ 312). WEIDENHAGEN versuchte anfangs, die Sonderexistenz eines zweiten Saccharase spaltenden Enzyms überhaupt zu leugnen und hielt auch die Takasaccharase für eine — allerdings etwas abweichende, s. o. — Fructosacch., während er das Angreifen von Melecitose durch Taka auf das vorherige Eingreifen einer Turanase zurückführen wollte, nach deren Wirkung eben Saccharose übrig bleiben und von der Fructosacch. ganz normal weiter zerlegt werden sollte. Später aber hat er auch dieses Angreifen der Melecitose einfach auf die Maltase bezogen, wie er denn überhaupt die zweite Rohrzucker-Spaltung nunmehr zwar anerkannt, aber im Rahmen seiner Gesamttheorie auf seine allgemeine einzige α-Glucosidase bezogen hat, in der die Glucosaccharase also restlos aufgehen soll. Darüber s. § 300.

Sieht man von diesem etwas einseitigen und wahrscheinlich nicht zutreffenden Erklärungsversuch ab, so bleibt das Problem Gluco-saccharase noch recht im Dunklen. Entweder gibt es wirklich zwei Saccharasen; dann ist ihre Verteilung in den verschiedenen Mikroben ganz unberechenbar; oder aber die Prüfung auf Melecitose resp. Raffinose gibt keine völlige Sicherheit, dann ist eben die Affinität zur jeweils Fructose oder Glucose keine konstante Größe und wir kommen zu dem recht unwillkommenen Ausweg einer verschwommenen Spezifität, wie wir es oben angedeutet haben. Die Hoffnung, daß eine genauere Untersuchung der tierischen Saccharase mit einer vielleicht festeren Spezifität hier eine Klärung bringen könnte, hat sich auch noch nicht erfüllt, man kann nur vermuten, daß diese äußerlich erheblich abweichende Sacch. eine Gluco-sacch. ist, aber exacte Untersuchungen liegen nicht vor (§ 322). So muß man die endgiltige Lösung dieses theoretisch ungemein wichtigen Problems der Zukunft überlassen; vielleicht ge-

---

12) ***R. Weidenhagen, E. Landt,*** Anw. des Massenwirkungsges. auf die enzym. Rohrzuckerspalt. Zs. V. D. Zuck. **80**, 25 (1930). — 13) ***D. Hitchcock,*** The formal ident. of LANGMUIR's adsorption with the law of mass action. Jl. Amer. Chem. Soc. **48**, 2870 (1926).

lingt einmal eine klare präparative Trennung von Fructosaccharase und Glucosacch., wie von letzterer und Maltase.

Ein ganz ähnliches Problem der relativen Spezifität bietet sich nun bei der **Maltase** dar. Maltose enthält zwar zwei gleiche Glucosekerne in α-Bindung, aber sie sind eben dadurch verschieden, daß der eine in C1 gebunden ist, der andere in C1 frei (Formel § 323). Es ist nun vorstellbar, daß es auch hier zwei Abarten von Maltase gibt, die sich durch ihre verschiedene Affinität einmal zur in C1 freien Glucose, ein andermal zur Glucosidogruppe unterscheiden. Ein Enzym, das Affinität nur zur freien Glucose hat, würde seine Affinität einbüssen, wenn an der freien Glucose in C_1 eine Änderung eintritt, wenn z. B. α-Methyl-glucosid gegeben wäre; dies wäre also unspaltbar. Dagegen wäre es für eine andere α-Glucosidase mit betonter Affinität zur Glucosidbindung in 1 gleichgiltig, ob diese Bindung zu einem zweiten Mol. Glucose oder zum Methyl führt, d. h. das Enzym würde alle α-Glucoside ebensogut zerlegen wie die α-Glucosido-glucose, die Maltose selbst. Nun gibt es zweifellos zwei solche Maltasen, als deren Typus von jeher auf der einen Seite (Spaltung aller α-Glucoside) die der Hefe, auf der anderen Seite (Nicht-Spaltung der α-Hetero-Glucoside) die tierische, die Takamaltase und die der Samen (Gerste, Malz) stehen. Tatsächlich hat LEIBOWITZ **14), 15)** die beiden Typen auf die oben geschilderten Affinitäten zurückgeführt und nennt sie deshalb **Glucosidomaltase** (Hefetypus) und **Glucomaltase** (Gerstentypus):

Zur weiteren Bekräftigung dienen noch die Beobachtungen, daß Veränderungen an der freien C_1-Gruppe der Glucose die Glucomaltase unwirksam machen, z. B. Osazonbildung oder Anlagerung eines Methyl (β-Methylmaltosid), während Glucosidomaltase dagegen indifferent ist. Andererseits kann eine Veränderung der gebundenen Glucose die Hefenmaltase unwirksam machen, die z. B. α-Methyl-Gentiobiosid nicht angreift (Zuwachs einer β-Glucose), oder Reduktion der CH_2OH-Gruppe in C_6 zu CH_3: Methyl-isorhamnosid ist gegen Hefenmaltase resistent. Auch aus kinetischen Messungen (KUHN) scheint hervorzugehen, daß die tierische Maltase (Pankreas) am freien Glucoseteil ansetzt und hier eine erheblich stärkere Affinität entwickelt, als Hefenmaltase an der gebundenen Glucose, etwa 10 mal so groß. Wir kommen § 324 auf diese Theorie zurück; hier nur die Angabe, daß WEIDENHAGEN (l. c. 31) sie von vornherein für unrichtig erklärt und diesen Widerspruch aufrecht erhalten hat.

Genau dasselbe Problem, aber experimentell noch viel weniger geklärt, liegt bei der **Lactase** vor. Lactose ist eine β-Galactosido-glucose. Im Sinne von LEIBOWITZ könnte es also zwei Lactasen geben, eine β-Galactosidase, und ein Enzym, das an der freien Glucose ansetzt; eine Galactolactase und eine Glucolactase. Tatsächlich sind seit langem zwei Lactasen beschrieben (H.W. S. 627 ff.): wieder scheint die der Hefen eine Galacto-lactase zu sein, die der höheren Pflanzen (Emulsin) und der Tiere eine Gluco-lactase; z. B. soll nur die erstere Derivate mit veränderter Glucosegruppe (Lactobionsäure, Lactosazon) spalten und die tierische wird nur von Glucose, nicht von Galactose gehemmt (*l. c. 739, 893*). Eine exakte Untersuchung liegt nicht vor; nach WEIDENHAGEN (l. c. 26) sind die als Stützen für die Existenz einer „Glucolactase" angegebenen Tatsachen irrig, Lactosazon wird in jedem Falle gespalten, und die Gluco-lactase existirt nicht.

Noch weniger aufgeklärt sind zwei weitere Fälle anscheinender Verschiedenheiten

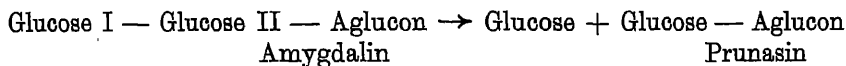
---

14) ***J. Leibowitz,*** Gerstenmalz-Maltase. Zs. phys. Chem. **149,** 184 (1925), **172,** 319 (1927). — 15) ***J. Leibowitz, P. Mechlinski,*** Takamaltase und Takasacch. ebd. **154,** 64 (1926).

sehr ähnlich wirkender Enzyme; LEIBOWITZ möchte auch hier sein Schema der Glucosido- und Glucomaltase anwenden, jedoch gibt es auch andere Deutungen, und das experimentelle Material ist lückenhaft.

Der eine bisher überhaupt wenig bearbeitete Fall betrifft das Enzympaar **Melibiase-Galactoraffinase.** Beide spalten die α-Galactosido-glucose Melibiose (§ 331). Aber die eigentliche Melibiase (der Unterhefen) greift Raffinose (Galactose-Glucose-Fructose) nicht an, während die Galactoraffinase (des Emulsins der Mandeln etc.) Raffinose in Saccharose + Fructose spaltet, wie durch NEUBERG längst bekannt (H.W. S. 630). (Saccharasehaltige Hefen zerlegen natürlich Raffinose ganz, aber unter primären Abspaltung der Fructose und Angriff an der freien Melibiose.) Hier könnte also der Fall genau so liegen wie bei den Maltasen. Eine α-Galactosido-melibiase könnte an der Galactosidbindung ansetzend die gebundene Melibiose spalten, es wäre das F. des Emulsins; die eigentliche Melibiase der Hefen wäre eine Gluco-melibiase, ihre Affinität zur freien Glucose wird aufgehoben, wenn an dieser eine Substitution erfolgt, wie es durch Eintritt der Fructosegruppe der Fall ist. Auch hier ist eine Entscheidung bisher nicht zu fällen; WEIDENHAGEN gibt mit Recht an, daß die bisherigen Argumente für eine Trennung nicht ausreichen; Wirkung auf einfachere Substrate und Kinetik sind identisch, nur der ph verschieden; bleibt also unerklärt vorläufig nur die Nicht-wirkung von Hefen-Melibiase auf Raffinose. Näh. § 331.

Ein noch interessanterer, aber ebenso unklarer Fall ist der des Enzympaares **Gentiobiase—Amygdalase.** Die Sachlage ist die: ein F. des Emulsins spaltet direkt aus dem Amygdalin heraus dessen Biose, indem eine Glucose freigesetzt wird, die andere mit dem Aglucon (Benz-aldehyd-cyanhydrin) als Prunasin zusammenbleibt. Dasselbe leistet ein Enzym aus Hefe (H.W. S. 584—588). Dieses F. nannte man Amygdalase, weil man die — bis dahin nicht aufgeklärte — Biose Amygdalose nannte.

Glucose I — Glucose II — Aglucon → Glucose + Glucose — Aglucon
Amygdalin Prunasin

Prunasin wird dann erst durch die β-Heteroglucosidase (Phenolglucosidase, Prunase) weiter zerlegt, ebenso wie Salicin etc. Dies ist also ein β-Ferment, die Amygdalase hielt man zunächst (wegen der Wirkung der Hefe) für ein α-Ferment. Dann aber erfolgte die Feststellung, daß die Biose des Amygdalins Gentiobiose ist, also eine β-Glucosido-glucose. Die Amygdalase der Hefen ist also auch ein β-Enzym.

Damit war also eigentlich die Wahrscheinlichkeit gegeben, daß dieses Enzym der Hefen (Amygdalase) auch freie Gentiobiose spalten sollte, was aber nicht der Fall ist: dieses β-Enzym der Hefen greift freie Gentiobiose nicht an, es zerlegt nur die gebundene Gentiobiose im Amygdalin in Agluconbindung und in der Gentianose in weiterer Bindung an Fructose (β-Glucose — β-Glucose — Fructose); β-Methyl-gentiobiosid wird wieder ebensowenig gespalten wie freie Gentiobiose. Dies gilt für Oberhefen, in denen Gentiobiase im eigentlichen Sinne nicht vorkommt; in einigen Unterhefen findet sich auch die — sonst den Schimmelpilzen vorbehaltene — Gentiobiase selbst. Danach sind also „Amygdalase" mit ihrer ausschließlichen Wirkung auf eine Gentiobiose in anderweitiger Bindung und „Gentiobiase" mit Wirkung auf freie Gentiobiose wirkungsverschiedene Enzyme. Indessen hat dieser Schluß bisher noch rein experimentell eine Lücke. Es fehlt noch der Gegen-versuch, daß reine Gentiobiase umgekehrt Amygdalin und Gentianose nicht angreift, sondern eben wirklich nur freie Gentiobiose.

Nach dem bisher vorliegenden Material ist die Sachlage sehr schwierig zu deuten. LEIBOWITZ (l. c. 14) hat es in analoger Weise versucht, wie bei den Maltasen, er ist darüber mit

JOSEPHSON 16) in eine Diskussion geraten, die nach seiner Berichtigung 17) auf einen Schreibfehler seinerseits zurückzuführen ist. Aber auch damit ist die Sache nicht klar geworden. LEIBOWITZ stützt sich darauf, daß Amygdalase (Hefe) freie Gentiobiose und Methyl-Gentiobiosid nicht angreift, beide nur von Gentiobiase (Schimmelpilze) zerlegt werden. Daraus schließt er, daß Gentiobiase auf die β-Glucosidbindung I eingestellt ist, Amygdalase auf die Glucose in der Glucosidbindung an das Aglucon II. Gentiobiase soll mit anderen Worten das β-Methylgentiobiosid ebenso als „Glucosido-gentiobiase" mit zerlegen, wie die „Glucosido-maltase" das α-Methylglucosid. Es ist aber dann nicht einzusehen, warum Gentiobiase nicht auch dasselbe tun sollte, wenn die Glucose an das Aglucon gebunden ist; diese Spaltung von Amygdalin selbst durch reine Gentiobiase ist wie gesagt bisher nicht geprüft. Wenn diese Spaltung aber statthat — und nach LEIBOWITZ' eigener Angabe sollte dies eigentlich so sein —, so gibt es hier keinen Unterschied zwischen beiden Enzymen, und es ist eine sehr gewundene Annahme, wenn L. die „Amygdalase" dadurch charakterisiren will, daß sie nur auf die specielle Bindung Glucose-Aglucon eingestellt ist und deshalb weder freie, noch an Methyl gebundene Gentiobiose angreift. Dann ist es aber wieder nicht zu verstehen, warum Amygdalase (Emulsin) Gentianose angreift. (Glucose—Glucose—Fructose) und sie in β-Glucose + Saccharose spaltet; denn wenn sie specifisch auf die Aglucon-Bindung eingestellt ist, so sollte sie auch bei dieser Holosidbindung nicht wirken können, so wenig wie bei der Methylbindung. Diese ganze Deutung ist überaus unklar, und schon im Prinzip bedenklich: wenn die Amygdalase auf II eingestellt ist, warum wirkt sie denn selektiv nur bei I?

Ich hatte mir — auf grund des „Schreibfehlers" (der grade im entscheidenden Punkt die Ansichten von L. verzerrt hat) im „Lehrbuch der Enzyme" S. 269 (1927) vor Kenntnis der Einwände JOSEPHSON'S und der „Berichtigung" von LEIBOWITZ provisorisch eine andere Ansicht gebildet. „*Gentiobiase ist specifisch eingestellt auf die Glucosegruppe in der freien Gentiobiose, während Amygdalase auf die Glucosido-gruppe eingestellt ist. Infolgedessen kann Gentiobiase das Amygdalin mit der veränderten Glucosegruppe ebensowenig angreifen, wie die Glucomaltase das Maltosazon, während Amygdalase dadurch nicht gestört wird, da sie die andere, nicht belastete Glucosegruppe ergreift und abspaltet. Ebenso spaltet die Amygdalase des Mandelemulsins die Gentianose in Rohrzucker + Fructose.*" Diese ganz vorläufige Deutung erklärt auch wieder nicht, warum Amygdalase β-Methylgentiobiosid nicht spaltet, und rechnet mit der — heute noch nicht gesicherten — Unspaltbarkeit des Amygdalins und der Gentianose durch reine Gentiobiase. Ehe dies nicht experimentell geklärt ist, ist die ganze Frage nicht zu entscheiden. Immerhin nähert sich JOSEPHSON'S 16) Deutung insofern der meinen, als auch er als Hauptmoment die Frage: freie oder gebundene Gentiobiose ansieht. Nach seiner Ansicht haben beide Enzyme ihre Hauptaffinität nach der nicht holosidisch gebundenen Glucose II hin. Solange diese frei ist, hat das Substrat die Hauptaffinität zur Gentiobiase; sobald Substitution gegeben ist (Fructose oder Aglucon) wird die Affinität zur Amygdalase umgeschaltet. Daß sich β-Methyl-gentiobiosid wie freie Gentiobiose verhält (spaltbar nicht durch Amygdalase), mag nach JOSEPHSON darin seinen Grund haben, daß hier beide Glucosen Pyranosen sind, während man im Amygdalin selbst vielleicht mit einer Glucofuranose zu rechnen hätte, wofür allerdings keine Hinweise vorliegen. Wie man sieht, ist diese ganze principiell wichtige Sache noch vollkommen unklar.

Dieser so intensiv bearbeitete und doch noch so unklare Fall des Amygdalins wird unter den komplizirteren Heterosiden nicht der einzige bleiben, der besonders diffizile Spezifitätsprobleme aufwerfen wird. Bei anderen Heterosiden von Biosen finden wir ähnliche Komplikationen, aber die Fragen sind noch zu wenig zielbewußt bearbeitet, um Bestimmtes aussagen zu können. Bei den natürlich vorkommenden Heterosiden von Biosen finden wir häufig den Fall, daß Enzyme, sei es nun die allgemeine Hetero-

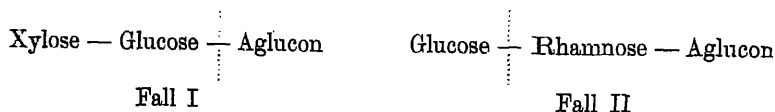
---

16) ***K. Josephson***, Amygdalase etc. Zs. phys. Chem. **169**, 301 (1927). — 17) ***J. Leibowitz***, Gerstenmalz-Maltase etc. Berichtigung. ebd. **172**, 319 (1927).

glucosidase oder auch besondere Spezial-enzyme, aus der eine Glucose enthaltenden Biose nur eine Glucose herausspalten und neue Heteroside nunmehr mit nur einem Zuckerrest hinterlassen, z. B. mit Rhamnose oder Digitoxose, die dann meist bisher als enzymatisch unspaltbar angesehen werden. Wenn man aber (durch Säurespaltung) die Biose als Ganzes vom Aglucon abtrennt, so ist diese in freiem Zustande häufig wieder enzymatisch spaltbar wie Vicianose oder Primverose, häufig aber unspaltbar wie z. B. die Strophanto-biose. Daneben finden sich noch andere verwickelte Fälle, über die §§ 342a, 361 Näheres berichtet wird. Ganz generell sprechen diese leider noch nicht exakt genug untersuchten Fälle dafür, daß in der Tat die Bindung an das Aglucon erhebliche Verschiebungen im enzymtypischen Verhalten der Biosen zu wege bringen kann.

Einer der noch am besten bekannten Fälle ist die Spaltung der Primveroside, z. B. des Monotropitosids durch das Enzympräparat Rhamnodiastase (§ 337). Hier ist der Entdecker dieser Spaltungen, Bridel, selbst späterhin zu der Auffassung gelangt, daß die in toto erfolgende Abspaltung der Biose Primverose, einer Xylosido-glucose, nicht durch ein Spezial-enzym erfolgt, sondern durch die allgemeine Hetero-glucosidase, und daß diese Vereinfachung für alle die von ihm und seinen Schülern beobachteten Spaltungen von etwas abweichenden natürlichen Heterosiden gilt; daß diese nicht auf einer eignen „Rhamnodiastase", sondern auf diesem allgemein wirksamen Enzym, eben nur unter gewissen Verschiebungen der relativen Spezifitäten beruhen. Bei allen diesen Glykosiden befindet sich nämlich die Aglucon-bindung an der Glucose, so daß nach deren Lösung eben die Biose frei wird. Im Gegensatz dazu sitzt die Aglucon-bindung bei den oben erwähnten Hetero-biosiden mit in freiem Zustande unspaltbarer Biose an einem anderen Zucker, z. B. Rhamnose, der seinerseits erst wieder an Glucose gebunden ist, so daß bei der Lösung der Glucose-bindung nicht eine Biose, sondern ein neues Heterosid entsteht.

Xylose — Glucose ⋮ Aglucon — Fall I

Glucose ⋮ Rhamnose — Aglucon — Fall II

Auf diese unklaren Dinge kommen wir wie gesagt §§ 342a, 361 im Einzelnen zurück. An dieser Stelle seien nur noch einige Befunde an synthetischen Hetero-biosiden wiedergegeben; auch hier muß man sich damit begnügen, vorläufig nur die Tatsachen zu geben als Material für eine später zu erhoffende Klärung des ganzen Fragenkomplexes.

Helferich c. s. 18) haben auf synthetischem Wege (aus Tribenzoyl-α-methyl-glucosid + Aceto-brom-glucose) das α-Methyl-gentiobiosid dargestellt, also das β-Glucosido-α-Methyl-glucosid, dessen Glucosido-bindung in C 6 der in C 1 methylirten α-Glucose ansetzt, und β ist. Tatsächlich wird dieses Heterosid durch Emulsin an dieser β-Bindung gespalten, also in Glucose + α-Methylglucosid. Dagegen wirkt α-Glucosidase (Hefe) nicht auf die α-Bindung des Methyls. Andererseits wird das strukturell ähnliche, aber konfigurativ entgegengesetzte β-Methyl-maltosid (α-Glucosido—β-methylglucosid) ganz normal so zerlegt, daß Maltase Glucose + β-Methyl-glucosid bildet, Emulsin aber Maltose + Methanol (Emil Fischer, Helferich). Ebenso verhält sich β-Phenol-maltosid. Auch diese Beobachtung ist wichtig für

---

18) ***B. Helferich, J. Becker***, Synth. eines Disacch.-Glucosids. Ann. Chem. Pharm. (Liebig) **440**, 1 (1924). S.A.

die relative Spezifität der Maltasen, weil angeblich die „Gluco-maltase" diese Spaltung nicht vollzieht (§ 324).

Weiterhin hat PETERSEN 19) (bei HELFERICH) eine Reihe von Biose-glykosiden untersucht und zwar angesichts der Tatsache, daß nach HELFERICH stets die Phenol-glykoside leichter spaltbar sind als die Methyl-glykoside, hauptsächlich mit Phenol.

In der α-Reihe wurden dargestellt: Phenol-lactosid und Phenol-cellobiosid. Beide erwiesen sich gegen α-Glucosidase als resistent. Hier bei dieser inversen Bindung in β-Biose-α-glykosiden hat also der neue „Substituent" Hexose an der ersten Hexose dieselbe Wirkung wie irgend eine Substitution bei einfachen Methyl-glykosiden: er verhindert die Spaltung. β-Glucosidase zerlegt das α-Phenol-cellobiosid in Glucose + Phenol-α-glucosid, also ganz entsprechend dem α-Methyl-gentiobiosid (s. o.).

In der β-Reihe wurden die soeben erwähnten Spaltungen von β-Methyl- und β-Phenol-maltosid durch Emulsin in Maltose + Aglucon zwar bestätigt, aber nur qualitativ. Sie verlaufen nämlich sehr langsam und können auch durch hochwertige Präparate von β-Glucosidase nicht beschleunigt werden. PETERSEN rechnet deshalb mit der Möglichkeit, daß hierfür ein eigenes Enzym notwendig ist. Er glaubt, daß auch hier die ursprüngliche Affinität der β-Glucosidase an sich durch den Eintritt eines neuen „Substituenten" in C 4 aufgehoben wird; und daß die Spaltung durch eine besondere Affinität zu einer eigenen spezifischen **β-Maltosidase** erfolgt, die in verschiedenen Emulsin-präparaten in verschiedener Menge vorhanden ist. Damit wäre nun tatsächlich eine neue Gruppe von Fermenten angenommen, nämlich **Hetero-biosidasen.** Eine Bestätigung dieser Annahme wäre von großer Bedeutung auch für die Aufhellung einiger bisher ganz unklarer Sachlagen bei natürlichen Hetero-biosiden, bei denen die Spaltung durch Mandel-emulsin abgestritten wird, z. B. bei der Rubierythrinsäure des Krapps (*Rubia tinctorum*). Dieses Glykosid enthält eine Biose aus Glucose + einer bisher nicht sicher erkannten Pentose. Weiter wäre es wichtig auch für die Aufklärung der Spaltung einiger natürlicher Heteroside, die Biosen aus Glucose + Rhamnose oder Glucose + Digitoxose etc. enthalten, bei denen aber die Verhältnisse noch komplizirter liegen (§ 342a).

Es sei noch erwähnt, daß PETERSEN in Analogie damit auch mit der Möglichkeit der Existenz einer α-Maltosidase rechnet; sie könnte bei der Auslösung der Maltose-gruppen aus den Ketten beim Abbau der Stärke eine Rolle spielen.

Alle diese Arbeiten dienen natürlich dem Endzweck, mehr Licht über das Wesen der „relativen Spezifität" einerseits zu verbreiten, andererseits über das Grundproblem, worauf sich die specifische Wirkung überhaupt stützt, mit anderen Worten, wie sich die Angriffsfähigkeit eines Substrates durch ein einheitliches Enzym gestaltet, wenn man die supponirte Angriffsgruppe irgendwie verändert. Darüber ist schon im Hauptwerk an den verschiedensten Stellen, die Glykosidasen aller Art betreffend, Material gegeben worden, insbesondere §§ 29—31, 299, 343. Weiteres werden wir natürlich bei den einzelnen Glykosidasen finden.

Hier sei nur noch wegen des allgemeinen Interesses darauf hingewiesen, daß anscheinend die β-Glykosidasen weniger empfindlich gegen Strukturänderungen sind als die α. Es mag dies damit zusammenhängen, daß es eine sehr große Anzahl verschiedener natürlicher β-Heteroside gibt, aber wahrscheinlich kein einziges natürliches α-Heterosid. Wenn ich also auch vorläufig daran festhalten möchte (§ 300), daß es zum mindesten zwei verschiedene Enzyme allein unter den β-Glucosidasen gibt, nämlich Cellobiase—Gentiobiase—Amygdalase und eine Hetero-glucosidase, und weiter, daß diese von den β-Galactosidasen wirklich verschieden sind, so ist doch allein die Zahl der z. T. strukturell recht verschiedenen natürlichen β-Hetero-glucoside sehr groß, und wenn sie wie

---

19) ***S. Petersen,*** Zur ferm. Spaltg. von Disacch.-Glykos. Ber. Sächs. Akad. Wiss. 85 (1933). S.A.

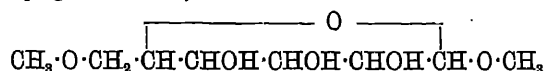
wahrscheinlich alle von einem Enzym zerlegt werden, so muß man diesem schon deswegen eine gewisse Anpassungsfähigkeit zuschreiben. Jedenfalls ergeben Befunde von HELFERICH 18), 20), daß Änderungen der Struktur bei α mehr ausmachen als bei β. Freilich gibt es auch hier wieder Ausnahmen, so fehlt bei α die schnellere Spaltung der Ortho-kresol-Glykoside gegenüber meta und para, die für β typisch ist.

Wenn man von den beiden Methyl-glucosiden ausgeht und nun Änderungen an der Glucose vornimmt, so ergeben sich folgende Verschiedenheiten (§ 334):

α-Methylglucosid Veränderung	Produkt	Spaltbarkeit	β-Methylglucosid Veränderung	Produkt	Spaltbarkeit
Ersatz des CH_2OH in 6 durch CH_3	α-Methyl-iso-rhamnosid	—	desgl.	β-Methyl-iso-rhamnosid	+
Einführung eines Methyls in 6	6-Methyl-α-methylglucosid	—	desgl.	6-Methyl-β-methyl-glucosid; (Phenol-glucosid s.u.)	— +
Einführung einer Glucose in 6	α-Methylgentio-biosid	—	desgl. in 4 desgl. in 6	β-Methylmaltosid β-Methylgentio-biosid	+ +

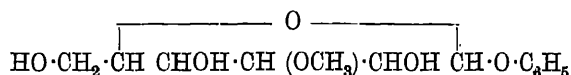
Aber auch hier finden wir wieder, was sich so häufig zeigt: bei solchen Änderungen fassen wir manchmal grade Grenzfälle, wo es sich nur um „spaltbar" oder „unspaltbar" dreht; aber wenn man dann genauer untersucht, so stößt man wieder auf die quantitativen Verhältnisse. Es geht dann die Skala von „schnell spaltbar" zu „langsam", „schwer", „kaum noch", bis man eben die Schwelle der nachweisbaren Spaltung unterschreitet. Für diese Zwischenstadien, und besonders wenn man sich dieser Schwelle nähert, tritt dann der bedeutungsvolle Frage auf, ob man so minimale Spaltungskatalysen noch als specifische Enzymkatalysen auffassen darf, oder ob man dabei nicht in das Gebiet unspecifischer, geringfügiger Reaktionsbeschleunigungen gerät; diese Frage wird man sich grade öfters im Anschluß an HELFERICH's Studien über die Beziehungen von Strukturänderungen zur Spaltbarkeit stellen müssen, also bei der Frage, ob strukturelle oder sterische Änderungen (an den anderen C-Atomen der Zucker, nicht an C 1) im Gerüst der Monosen absolut entscheidend sind für den spezifischen Angriff, oder etwa nur die Affinität vermindern; darüber s. a. § 300.

Hier nur noch eine Ergänzung zu der obigen Tabelle. Da überall die Phenolglykoside leichter spaltbar sind als die des Methyls, so hat HELFERICH auch anstelle des unspaltbaren 6-Methyl-β-methyl-glucosids 21)

$$CH_3{\cdot}O{\cdot}CH_2{\cdot}\underbrace{CH{\cdot}CHOH{\cdot}CHOH{\cdot}CHOH{\cdot}CH}_{O}{\cdot}O{\cdot}CH_3$$

das entsprech. 6-Methyl-β-phenol-glucosid hergestellt; dies ist nun im Gegensatz zum

20) ***B. Helferich, W. Klein, W. Schäfer***, Spec. der α-Glucosidase. Ber. Chem. Ges. **59**, 79 (1926). — 21) ***B. Helferich, E. Günther***, Deriv. des d-Glucose-6-Methyläthers. Ber. Chem. Ges. **64**, 1276 (1931).

ersteren durch Emulsin spaltbar (22). Genau ebenso verhalten sich die beiden 6-Bromhydrine: Methyl unspaltbar, Phenol spaltbar (HELFERICH und APPEL, § 343). Dagegen macht Einführung eines Methyl an C 3 das 3-Methyläther-phenol-β-glucosid

$$HO\cdot CH_2\cdot \overset{|}{C}H\ CHOH\cdot CH\ (OCH_3)\cdot CHOH\ \overset{|}{C}H\cdot O\cdot C_6H_5 \quad \text{(O-Brücke zwischen den markierten CH)}$$

unspaltbar (22a). Weitere Einzelheiten im Kap. Hetero-glucosidasen, §§ 336, 343.

§ 300. Das System von Weidenhagen 25), 26) (l. c. 1, 2). Wir haben immer wieder betont, daß es bei dieser Sachlage eine rein definitorische Willkür ist, ob wir nun von zwei verschiedenen Saccharasen resp. Maltasen sprechen wollen oder von zwei Typen eines und desselben Fermentes. Bei der Spärlichkeit unserer Kenntnisse über die chemische Natur der Enzyme bleibt uns vorläufig kaum etwas anderes übrig als anzunehmen, daß beide Maltasen dieselbe strukturelle Wirkungsgruppe (Agon) haben, und daß nur das sonstige wirksame System (Pheron) verschieden ist. Es ist dabei noch nicht einmal gesagt, daß das eigentliche allerengste System Agon + Pheron verschieden ist; es ist ebensogut möglich, daß es nur die sonstigen, zum weiteren System Enzym gehörigen Begleitsubstanzen sind, welche den Affinitätsverschiebungen zugrundeliegen. Es wären dann etwa bei den Saccharasen nur verstärkte Differenzen gegenüber den Affinitätsverschiebungen, wie wir sie bei verschiedenen Hefen bemerken, sowohl gegen Rohrzucker an sich, wie im Verhältnis der Spaltung von Rohrzucker zu Raffinose etc. Dafür sprechen auch Befunde, daß manche Hefen beide Typen, oder eben Übergangstypen zwischen Fructo- und Glucosaccharase enthalten.

Bei dieser Sachlage ist also WEIDENHAGEN (l. c. 1, 2) formal im Recht, ~~wenn er den~~ Versuch macht, in seinem System der Carbohydrasen die Dinge dadurch aufs äußerste zu vereinfachen, daß er alle diese Unterspecifitäten und Verschiebungen für die Klassifikation nicht anerkennt, diese differierenden Enzyme für diesen Zweck als ein Enzym aussieht, so daß er nun mit nur wenigen Sonderenzymen auskommt. Eine andere Frage ist, ob alle experimentellen Belege, die WEIDENHAGEN zu gunsten seines Systems anführt, stichhaltig sind, und das ist noch durchaus nicht klar, und somit viele Einzelheiten seines Systems noch stark umstritten. Andererseits ist HELFERICH in einigen Punkten noch über WEIDENHAGEN hinausgegangen. Die meisten Einzelheiten werden wir erst bei den einzelnen Enzymen geben können; hier nur das Prinzip und die Problematik des neuen Systems.

WEIDENHAGEN formulirt den Kernpunkt seiner Specifitätstheorie wie folgt (l. c. 2, S. 445):

Nach dieser Annahme kann man grundsätzlich nicht von Enzymen sprechen, die singulärspezifisch auf bestimmte Glykoside, Di- oder Trisaccharide eingestellt sind. Es gibt nur Glykosidasen, deren Hauptspezifität auf die Konstitution und Konfiguration des glykosidisch verknüpften Zuckers beschränkt ist. Die Natur des anderen Paarlings hat nur sekundäre Wirkungen auf die Spezifität, vor allem in quantitativer Hinsicht, also die relative Spezifität.

---

22) ***Dies.***, Spaltbark. des Phenol-β-d-glucosid-6-Methyläthers. Zs. phys. Chem. **231**, 62 (1934). S.A. — 22a) ***Ders., O. Lang,*** Emulsin XI. ebd. **216**, 123 (1933). S.A. — 25) ***R. Weidenhagen,*** Zur Frage der enzym. Rohrzuckerspaltung. Naturwiss. **16**, 654 (1928), Zs. V. D. Zuck. **78**, 539, 781 (1928). — 26) ***Ders.,*** Specif. u. Wirk. Mech. der zuckerspalt. Enzyme. ebd. **79**, 115 (1929) S.A.

Danach schrumpft die Zahl der wirklich verschiedenen Enzyme auf ganz wenige zusammen, und alle so häufig nachgewiesenen Differenzen im Vorkommen, der Wirksamkeit, des opt. ph etc. werden auf relative Spezifitätsverschiebungen, also im Sinne unserer Auslegung auf das wechselnde allgemeinere System zurückgeführt; es werden somit die Vorstellungen WILLSTÄTTER-KUHN's und EULER's auch auf solche Enzyme übertragen, die man für wahrhaft verschieden gehalten hat, wie die β-Glucosidasen Cellobiase, Gentiobiase und β-Heteroglucosidase (β-Phenolglucosidase, Prunase). Denn für diese Enzymart entscheidend soll ja nur das Vorhandensein einer β-Glucosido-Bindung sein.

Es beschränkt sich somit für die Hauptgruppen, also zunächst von den weniger wichtigen Heterosidasen (Pentosidasen etc.) abgesehen, das W.'sche System auf folgende Enzymarten, die mit den spaltbaren Substraten angeführt sind.

α-Glucosidase	zerlegt alle	α-Glucoside	(Maltose, Saccharose, Turanose, Melezitose),
β- „	„ „	β- „	(Gentiobiose, Cellobiose, Phenolglucoside),
α-Galactosidase	„ „	α-Galactoside	(Melibiose, Raffinose),
β- „	„ „	β- „	(Lactose, Phenolgalactoside usw.),
β-h-Fructosidase	„ „	β-h-Fructoside	(Saccharose, Raffinose, Gentianose).

Eine weitere Konsequenz der W.'schen Ideen ist, daß er sogar die principielle Trennung zwischen Oligasen und Polyasen nicht anerkennt, er hält es für wahrscheinlich (27), daß es auch keine Inulinase gibt, daß vielmehr Inulin durch die allgemeine Fructosidase gespalten wird (§ 412). Auch zwischen Cellulase und Cellobiase (β-Glucosidase) sollen nur relative Spezifitätsunterschiede gelten, worauf wir mit den anderen bestrittenen Punkten zusammen unten zurückkommen werden.

Eins der Kernstücke seiner Beweisführung liegt in der neuartigen Deutung des Problems der „Glucosaccharase". Er glaubt den Nachweis geführt zu haben, daß jenes Enzym, welches die Saccharose durch Angriff auf die Glucosidogruppe zerlegt, nicht eine besondere α-Glucosidase ist, sondern die Maltase an sich, die nach seiner Ansicht die einzige α-Glucosidase ist.

Natürlich erkennt er (28) die beiden fundamentalen Tatsachen der WILLSTÄTTER-KUHN'schen Beweisführung an, daß nämlich erstens unter den üblichen Versuchsbedingungen Hefe die Saccharose nur durch Angriff auf die Fructosido-Bindung, also durch Wirkung der klassischen Invertase zerlegt, und daß es nach WILLSTÄTTER und BAMANN 29) durch elektive Adsorption möglich ist, Invertase und Maltase quantitativ zu trennen. Aber er deutet dies dahin, daß eben nicht Invertase und Maltase getrennt sind, sondern β-am-Fructosidase und α-Glucosidase; und die Tatsache, daß diese α-Glucosidase Saccharose nicht angreift, liegt nur daran, daß sie bei dem verwendeten opt. ph der Invertase (4,7) überhaupt nicht wirkt; wohl aber greift Maltase bei etwa 7.0 auch Rohrzucker an, was eben früher niemand an reinen Maltasepräparaten geprüft hat, die soweit von Fructosidase befreit sind, daß sie bei 4,7 gar keine Wirkung auf Saccharose mehr ausüben.

Natürlich schreibt W. 30), 31) nun dieser allgemeinen α-Glucosidase auch die sonstigen

27) ***Ders.***, Enzym. Spalt. des Inulins. Naturwiss. **1932**, 254, Zs. V. D. Zuck. **82**, 316, 912 (1932) S.A. — 28) ***Ders.***, Trennung von α-Glucosidase und β-h-Fructosidase. Zs. V. D. Zuck. **80**, 155 (1930). — 29) ***R. Willstätter, E. Bamann***, Trennung von Maltase und Saccharase. Zs. phys. Chem. **151**, 273 (1926). — 30) ***R. Weidenhagen***, Saccharase-Spezif. — Enzym. Rohrzuckerspalt. I, II. Zs. V. D. Zuck. **78**, 406, 539, 781 (1928). S.A. — 31) ***Ders.***, Spec. der enzym. Maltose-Spalt. ebd. **78**, 788 (1928) S.A.

Wirkungen der Glucosaccharase KUHNS zu, nämlich das Versagen gegenüber Raffinose und die Zerlegung von Melecitose; nach seinen Befunden zerlegt Maltase jeglicher Herkunft, auch die des Malzes (Glucomaltase), die Melecitose glatt in Fructose und 2 Moll. Glucose, da beide Glucosen in α-Bindung stehen; es ist also auch Turanase = α-Glucosidase.

Letzteres wird von BRIDEL **32)** bestätigt, da Turanose nicht von Emulsin, aber glatt von Unterhefe-Extrakt zerlegt wird. Er bestätigt auch den Angriff von Melecitose durch Unterhefe **(32a)**.

Diese Ansichten WEIDENHAGEN's ebenso wie seine experimentelle Beweisführung haben viel Widerspruch hervorgerufen, worauf wir gleich zurückkommen werden. Andererseits hat in gewisser Beziehung HELFERICH **33)** (§ 343) in seinen Arbeiten über Mandel-Emulsin WEIDENHAGEN's Idee der Vereinfachung noch weiter getrieben. Zwar hat er selbst das W.'sche Schema insofern erweitert, als er im Emulsin die Sonderexistenz einer eigenen α-Mannosidase nachgewiesen hat (§ 330), sowie einer besonderen Chitinase, die auch Glykoside des N-Acetylglucosamins spaltet, und einer besonderen Glucuronidase. Aber er zweifelt an der wahrhaften Sonderexistenz von Glucosidasen und Galactosidasen, die er eventuell auch nur durch relative Specifitäten trennen möchte. Es käme dann als Gesamtergebnis der Ableitungen von WEIDENHAGEN und HELFERICH darauf hinaus, daß überhaupt nur zwei der Kohlenstoffatome in den Zuckern entscheidend für die Enzymaffinität in qualitativer Hinsicht sind, nämlich C_1 für die α, β-Specifität, die unbedingt streng zu sein scheint; und C_2 für Glucose, Mannose, Fructose, während die Änderung, die zur Konfiguration der Galactose führt, nicht zu einer absoluten, sondern zu einer relativen Änderung der Specifität führt.

HELFERICH's Argumente basiren darauf, daß alle Präparate von Mandel-Emulsin, die als Phenolglucosidase Salicin spalten, auch β-Methylglucosid angreifen, wenn auch viel schwächer (etwa 100 : 1) und weiter β-Galactoside wieder etwa 10 mal schwächer als die entspr. Glucoside. Auch auf Pentoside (Arabinose, Xylose) finden sich noch sehr kleine Wirkungen (Salicin: β-Methylxylosid ca. 1000 : 1).

Jedoch liegen bei diesen Pentosiden ganz besondere Verhältnisse vor, welche die Annahme etwa eigener Enzyme wenigstens für Xyloside und Arabinoside *) in jedem Falle entbehrlich machen, wie man dies für die — besonders leicht spaltbaren — Isorhamnoside seit EMIL FISCHER annimmt (§ 343). Denn diese Pentoside stehen in der Konfiguration den spaltbaren Hexosiden so nahe, daß sie sicherlich von denselben Enzymen gespalten werden, wenn auch eben in abgeschwächtem Maße. Die l-α-Arabinose **) entspricht der d-β-Galactose, und somit ist die Spaltung ihrer Glykoside, die bereits BRIDEL **34)** gefunden hatte, sicherlich auf die normale β-Galactosidase zu beziehen, und dementsprechend die der d-β-Xyloside auf die β-Glucosidase, da eben die d-Xylose (wie die Isorhamnose) der d-Glucose entspricht. Ganz analog

---

*) Für andere Pentoside gilt das natürlich nicht. Deren enzymtypisches Verhalten ist noch wenig geklärt. Für die natürlichen Glykoside der Ribofuranose, die Nucleoside, scheint es specifische Fermente, Nucleosidasen zu geben, auf die wir erst bei den Nucleasen im Zusammenhang eingehen. Andere, wie z. B. die natürlichen Rhamnoside, gelten vorläufig als enzymatisch unspaltbar (§ 361).

**) Es muß beachtet werden, daß nach der neueren Bezeichnung der Konfiguration im Sinne HUDSON's α- und β-Arabinose umgekehrt bezeichnet werden wie von EMIL FISCHER.

32) ***M. Bridel, Th. Aagard,*** Hydrol. diast. du turanose. C. R. **184,** 1667 (1927). — 32a) ***Dies.,*** Hydrol. diast. du méléc. etc. Bull. Soc. Chim. Biol. **9,** 884 (1927). — 33) ***B. Helferich*** (Zusammenf.), Specif. des Emulsins. Erg. Enzymf. **2,** 74 (1933). (Die Einzelmitteilungen von HELFERICH c. s. siehe bei Heteroglucosidasen (Emulsin), §§ 336, 343, 350). — 34) ***M. Bridel, C. Béguin,*** Synth. bioch. . . . de l'éthyl-l-arabinoside. Bull. Soc. Chim. Biol. **8,** 469 (1926).

Abgeschlossen: 20. 8. 35. Ber. Phys. 86, H. 5/6.

werden l-β-Arabinoside durch α-Galactosidase (Melibiase) gespalten. (Näh. s. b. HELFERICH **33**)). Bei anderen Glykosiden fand HELFERICH **34a**) ganz minimale, an der Fehlergrenze liegende Spaltungen, die nur noch bei Phenol-β-l-rhamnosid durch Emulsin diese etwas überschreiten, bei beiden Phenol-d-Arabinosiden und β-d-Fructosid nicht mehr (Näh. § 343). Wir brauchen uns also mit diesen winzigen Wirkungen auf die Pentoside nicht weiter zu beschäftigen, da in keinem Falle hier besondere Enzyme anzunehmen sind. Entweder handelt es sich eben um Restwirkungen der entspr. Hexosidasen mit immer schwächer werdender Affinität, also um Reste einer echten spezifischen Fermentkatalyse, oder möglicherweise um grade den Schwellenwert überschreitende nicht specifische Katalysen, durch im Milieu vorhandene Systeme von Kolloiden + Elektrolyten, wie sie ja auch sonst bisweilen angegeben werden und theoretisch keine besonderen Schwierigkeiten machen. Wichtig sind nur die Differenzen 1 : 10 zwischen der Wirkung auf Galactoside und Glucoside. Hier steht nur zur Entscheidung, ob zwei Enzyme gemischt vorkommen, oder eines um diesen Betrag verschiedene Affinitäten zu den beiden Arten von Glykosiden hat. Das ist auch nach HELFERICH's Meinung noch nicht restlos geklärt, und eine genauere präparative Verarbeitung kann die reelle Existenz der β-Galactosidase auch im Mandel-emulsin ebenso wieder herstellen, wie die der α-Mannosidase, die HELFERICH zu seiner eigenen Überraschung aus dem Emulsingemisch herauspräpariren konnte (§ 330.)

Wir wollen also diese Frage des Verhältnisses von Galactosidase zu Glucosidase an dieser Stelle nicht weiter erörtern. Es sprechen bis zur endgiltigen Klärung doch noch zu viele Beobachtungen über Vorkommen u. dgl. für die Eigenexistenz von β-Galactosidasen (Lactasen), als daß man hier schon klar sehen könnte.

Wir kommen darauf § 332 zurück; hier sei nur erwähnt, daß sich in Enzympräparaten anderer Herkunft ganz andere Relationen zwischen der glucosidatischen und galactosidatischen Wirksamkeit finden können, wie sie HELFERICH im Mandelemulsin fand. So fanden NEUBERG und HOFMANN **35**), **36**) viel mehr Galactosidase als Glucosidase in Milchzuckerhefen und im Emulsin von *Rosa canina* (**37**) und *Citrus nobilis* (Mandarine) (**37**). Bei Bakterien wie *B. coli* und *B. Delbrücki* war sogar nur Galactosidase zu finden (**36**), ebenso beim Emulsin von Sojabohnen (**37**), während umgekehrt *Mucor javanicus* nur Glucoside angreift, die Galactosidase ganz fehlt (**35a**). Nachdem dann HILL **37a**) im Institut von HELFERICH selbst zu der Ansicht gekommen war, daß im Emulsin der Luzerne (*Medicago sativa*) wahrscheinlich beide Gruppen von Enzymen verschieden sind, kommt HELFERICH selbst (**37b**) zu einer stärkeren Annäherung an die Auffassung, daß Glucosidasen und Galactosidasen zwei getrennte Fermentgruppen sind, daß andererseits wahrscheinlich die Galactosidasen verschiedener Herkunft verschieden sind. Darüber s. § 332. Auch auf die Nebenpunkte der WEIDENHAGENschen Theorie wollen wir hier nur kurz hinweisen. Seiner Ansicht, daß wahrscheinlich auch die Cellulase nichts weiter sei als die allgemeine β-Glucosidase, wird von GRASSMANN c. s. **38**), **39**) widersprochen. In einem Extrakt aus Schimmelpilzen lassen sich beide Enzyme präparativ trennen. Die Cellobiase spaltet nur Oligosen mit 2—6 Glucoseresten, die Cellulase neben Cellulose nur noch Lichenin, Cellodextrine und wiederum Cellohexaose. Nur bei dieser Stufe findet sich also ein Zusammentreffen der Spezifitäten beider Enzyme. Es ist also sehr wahr-

---

34a) ***B. Helferich, H. Appel, R. Gootz***, Emulsin X. Zs. phys. Chem. **215**, 277 (1933). S.A. — 35) ***C. Neuberg, E. Hofmann***, Neue Beob. über β-Glucosidase. Bioch. Zs. **256**, 450, 462 (1933). S.A. — 35a) ***E. Hofmann***, Glykosidasen, bes. in Schimmelp. u. Bakt. Naturwiss. **1934**, 406. S.A. — 36) ***Ders.***, Glykosidasen bzw. Galaktosidasen etc. in Bakt. (Schimmelpilzen). Bioch. Zs. **272**, 133, **273**, 198 (1934). S.A. — 37) ***Ders.***, Emulsin der Hagebutten — Versch. Pflanzenemulsine. Bioch. Zs. **267**, 309, **272**, 426 (1934). — 37a) ***Kurt Hill***, Luzerne-Emulsin. Ber. Sächs. Akad. Wiss. **88**, 115 (1934). S.A. — 37b) ***B. Helferich, H. Schreiber***, Emulsin XV. Zs. phys. Chem. **226**, 272 (1934). S.A. — 38) ***W. Grassmann, R. Stadler, R. Bender***, Spez. cellulosesp. Enzyme. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG) **502**, 20 (1933). S.A. — 39) ***W. Grassmann, L. Zechmeister, G. Tóth, R. Stadler***, Enz. Abbau der Cellulose etc. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG) **503**, 167 (1933). S.A.

scheinlich, daß bei beiden die Grundlage der Spezifität die β-Glucose ist, aber in bezug auf die Kettenlänge sind sie schließlich ebenso verschieden wie Dipeptidase und Tryptase. Sie sind also verwandt, aber nicht identisch, vielleicht haben sie dieselbe Wirkgruppe auf verschiedenen Trägern.

Nach GRASSMANN ist Cellulase ein absolut specifisches Enzym, ebenso verschieden von Cellobiase, wie von Xylanase, Mannanase, Inulinase. Wir wollen also von diesen Weiterungen, ob sich die Vereinfachungen über die bisherigen Gruppen hinaus erstrecken lassen, absehen und nur das Kernstück der W.'schen Systematik näher behandeln: ob es zulässig ist, alle Glucosidasen als nur zwei Enzyme, eine α- und eine β-Glucosidase zu betrachten.

Für die β-Glucosidasen liegt bisher wenig modern-exaktes Material vor. Die älteren Beobachtungen über Vorkommen etc. sprechen durchaus für die Existenz mindestens dreier Einzelfermente: Cellobiase, Gentiobiase und Phenolglucosidase (Heteroglucosidase, Prunase) (H. W. §§ 333, 335).

Aber alle diese Befunde sind bei der stets merkwürdig schwachen Wirkung aller dieser Enzyme auf die β-Hologlucoside nicht entscheidend. Von neueren Befunden sei hier nur erwähnt, daß nach GRASSMANN c. s. (l. c. 38) die β-Glucosidase der „Emulsins", die auf Gentiobiose eingestellt ist, Cellobiose nur schwach angreift, noch weniger Cellotriose sind -tetraose, während Cellulasepräparate, die also Cellobiase enthalten, Salicin überhaupt nicht angreifen, was besonders bei der ausserordentlichen Geschwindigkeit der Salicinspaltung durch β-Heteroglucosidase schwer in die Wagschale fällt. Zu entscheiden ist die Frage nicht, auch nach Kenntnisnahme weiterer Einzelkeiten; immerhin ist die Identität von Cellobiase und Gentiobiase wahrscheinlicher geworden, während die Prunase verschieden zu sein scheint (§ 336).

Nur auf eine theoretisch nicht uninteressante Deutung WEIDENHAGEN's sei schon hier hingewiesen: sie betrifft die Tatsache, daß die Emulsinspaltung beim Amygdalin damit beginnt, daß praktisch zuerst nur Amygdalose (gebundene Gentiobiose) durch die „Amygdalase" unter Abspaltung einer Glucose angegriffen wird; dann erst wirkt die „Prunase" (β-Heteroglucosidase) auf das Heterosid Prunasin. Das können natürlich zwei verschiedene Enzyme bewirken, müssen es aber nicht. WEIDENHAGEN ist ganz im Recht, wenn er darauf hinweist, daß es an sich ebensogut auch eins sein kann. Denn im Anfang ist ja garkein Prunasin vorhanden, und seine Spaltung kann somit in den Kurven erst dann hervortreten, wenn es in einer gewissen Konz. entstanden ist, und muss mit dieser Konz. zunehmen. Durch rein kinetische Betrachtung ist also ebenfalls ein Entscheid nicht möglich. — Die Rhamnodiastase (§ 337) scheint kein besonderes Enzym, sondern die β-Heteroglucosidase mit verschobener relativer Spezifität zu sein. Sie spaltet β-Primveroside schnell, β-Glucoside langsam, während Emulsin langsam auch Primveroside angreift (BRIDEL 40)). Primverose ist eine β-Xylosidoglucose (§ 334), die aus den Primverosiden bei der enzymatischen Zerlegung entsteht, vgl. dazu aber die Möglichkeit einer eigenen β-Heterobiosidase, geprüft am β-Methylmaltosid, bei PETERSEN (l. c. 19).

So konzentriert sich der Streit auf die α-Glucosidasen. Erstens, daß es nur eine Maltase gibt, aber keine Glucosido- und Glucomaltase, und zweitens, daß der Angriff der Saccharose an der Glucosido-bindung nicht durch eine besondere Gluco-saccharase, sondern durch die Maltase selbst erfolgen soll.

An der Peripherie dieser Fragen steht noch die nach dem Enzym, welches die Trehalose spaltet. Diese Biose gilt bisher auch als eine der α-Reihe; wenn nun dafür ein eigenes Enzym existirt, so wäre wieder eine neue, also eventuell die dritte α-Glucosidase gegeben, die Trehalase. Nun geben sowohl PRINGSHEIM wie WEIDENHAGEN (l. c. 31) selbst an, daß Maltase auf

---

40) ***M. Bridel,*** Reflex. sur les diast. etc. Bull. Soc. Chim. Biol. 8, 170 (1926).

Trehalose nicht wirkt, wohl aber Emulsin (§ 330). So scheint es denn doch ein spezifisches Enzym Trehalase zu geben, das sich in Schimmelpilzen, im Malz, unregelmäßig auch in Hefen findet. Freilich braucht es nicht eine typische α-Glucosidase zu sein; denn einerseits ist die α-Natur der Trehalose bisher nur errechnet, aber nicht gesichert, und ferner handelt es sich um ein Glucosido-glucosid, für dessen abweichende Bindungsform wohl ein besonderes Ferment vorhanden sein könnte, ohne die sonstigen Schlüsse W.'s zu entkräften.

Was nun die beiden Maltasen anlangt, so hat PRINGSHEIM **41)** in neueren Arbeiten die Angaben seines Schülers LEIBOWITZ bestätigt, daß es eine Glucomaltase gibt, WEIDENHAGEN hält an seinem Widerspruch fest. Es steht hier Meinung gegen Meinung, wir werden darauf § 324 zurückkommen.

Hier nur die wichtige Angabe W.'s **42)**, daß die sog. Gluco-maltase aus Taka zwar α-Methyl-glucosid nur schwach angreift, wohl aber energisch das α-Phenol-glucosid; dies als Entgegnung auf die Angabe PRINGSHEIM's, daß das Enzym aus *Asp. Wentii* α-Methyl-glucosid nicht angreift.

Am meisten Widerspruch hat die Gleichsetzung der Gluco-saccharase mit der Maltase erfahren, und hier liegt zweifellos der schwächste Punkt des W.'schen Systems der äußersten Vereinfachung, denn die bedingungslose Gleichsetzung Maltase—Saccharase ist tatsächlich nicht möglich.

Es sind Hefen und Mikroben gefunden worden (**43—45**, weitere Lit. § 324), die bei Wirkung auf Maltose Saccharose bei keinem ph angreifen; WEIDENHAGEN hat diese Versuche angefochten, die Gegner sie wiederholt und bekräftigt. Gewisse Stämme von *B. coli* greifen nur Maltose, nicht Saccharose an, was nunmehr auch TAUBER **47)** bestätigt. Auch Melecitose wird durch diese Maltase nicht angegriffen (KARSTRÖM **43)**); es ist also eine Maltase, keine Gluco-saccharase. Und endlich ist HOFMANN **48)** der Nachweis einer biologischen räumlichen Trennung von Maltase und Saccharase geglückt. Man nimmt seit langem an, daß die Hefen der Gattung *Schizosaccharomyces* keine Saccharase enthalten. HOFMANN fand nun in frischen Hefen und im Autolysesaft eine Maltase, die Saccharose nicht angreift, bei keinem ph, im Rückstand dagegen eine Rohrzuckerspaltung anscheinend durch eine Glucosaccharase (opt. ph = 5,6).

Das stärkste Argument gegen die Rohrzuckerwirkung der Maltase aber sind die an sich noch nicht sehr klaren Verhältnisse bei der Maltase tierischer Sekrete und Organe. Hier steht die Antwort auf die Grundfrage noch offen: Rohrzucker wird von Warmblüterorganen überhaupt nur von Darmschleimhaut und (schwach) von Leukocyten gespalten (H.W. S. 568). Diese tierische Saccharase greift Raffinose etc. nicht an und hat ein ph-Optimum bei ca. 7, ist also sehr wahrscheinlich die KUHN'sche Glucosaccharase (Wirbellose enthalten auch echte Invertase, H.W. S. 552). Nun kann man aber dieses vereinzelt vorkommende Saccharose spaltende Enzym unmöglich mit der überall zu findenden und auch in die Sekrete, Speichel, Pankreas etc. übergehenden tierischen Maltase identificiren, denn diese Maltase greift ja Saccharose überhaupt nicht an, trotzdem sie im Tiergewebe den opt. ph von ca. 7 vor-

---

41) ***H. Pringsheim, H. Borchardt, F. Loew***, Spec. der Saccharasen. Zs. phys. Chem. 202, 23, 207, 241 (1932/3). — 42) ***R. Weidenhagen***, Spec. der α-Glucosidase. Zs. phys. Chem. 216, 255 (1933). — 43) ***H. Karström***, Spez. der α-Glykosidasen. Bioch. Zs. **231**, 399 (1931). — 44) ***A. I. Virtanen***, Spec. der α-Glucosidase. Bioch. Zs. **235**, 490 (1931). — 45) ***K. Myrbäck***, Disacch.-Spalt. der α-Glucosidase. Zs. phys. Chem. **198**, 196 (1931), **205**, 248 (1932). — 46) ***R. Weidenhagen***, Spec. der α-Glucosidasen. Bioch. Zs. **233**, 318, Zs. phys. Chem. **200**, 279 (1931). — 47) ***H. Tauber, J. S. Kleiner***, Specif. of Maltase etc. Jl. of gen. Phys. **16**, 767 (1933), Jl. of biol. Chem. **99**, 241 (1932). — 48) ***E. Hofmann***, Maltase und Sacch. bei Schizosacch. octosporus etc. Bioch. Zs. **272**, 417 (1934).

findet; die Rohrzuckerspaltung ist ja wie gesagt überall außer Darmschleimhaut und Leukocyten vergeblich gesucht worden. TAUBER und KLEINER 47) haben neuerdings in diesem Sinne die Speichelmaltase und die der Milchdrüse tatsächlich auf Saccharose unwirksam befunden, ebenso wie auf α-Methyl-glucosid: sie spaltet eben in Bestätigung aller älteren Angaben nur Maltose, ist eine typische Glucomaltase.

Solange diese Verhältnisse nicht anderweitig aufgeklärt sind, ist daran festzuhalten, daß es im Tierkörper (Darm, Leucocyten) eine besondere Glucosaccharase gibt, und damit ist zunächst an dieser Stelle die Einheit der α-Glucosidase zerbrochen; dies gibt aber wieder den anderen Einwänden erhöhtes Gewicht. Bisher also kann diese Vereinheitlichung im Rahmen des WEIDENHAGEN'schen Systems nicht acceptirt werden.

§ 301. **Höhere Oligosen.** Die früher viel behandelte Frage, ob es für die Trisaccharide und höhere Einheiten besondere Enzyme gibt, ist nunmehr volkommen in dem Sinne geklärt, daß es solche nicht gibt. Alle höheren Oligosen werden in Stufen gespalten, und zwar durch die bekannten Enzyme der Biosen. Dies geht ja schon aus §§ 299, 300 deutlich hervor. Wir wollen uns also hier mit einer ganz kurzen Zusammenstellung der Spaltungen begnügen. Formeln und Einzelheiten im Spec. Teil.

Name	Aufbau	Spaltprodukte	Enzym
Raffinose	Fructose—Glucose$\overset{\alpha}{—}$Galactose	Melibiose Fructose	Fructosidase
„	„	Galactose Saccharose	Melibiase (Galactoraffinase des Emulsins)
Gentianose	Fructose—Glucose$\overset{\beta}{—}$Glucose	Gentiobiose Fructose	Fructosidase
„	„	Rohrzucker β-Glucose	Amygdalase (Emulsin)
Stachyose	Fructose—Glucose—Galactose —Galactose	Digalactosido- Glucose (Manni- notriose) Fructose	Fructosidase
Manninotriose ...	Glucose—Galactose—Galactose	Galactose Biose (Lactose??)	Lactase (?)
Melecitose	Glucose—Fructose$\overset{\alpha}{—}$Glucose	Glucose Turanose	Glucosaccharase

III. Reversion der Wirkung.

§ 302. Nachdem es völlig klargestellt war, daß die Synthesen von Heterosiden und Holosiden der verschiedensten Art nichts weiter sind als katalytisch beschleunigte Einstellungen echter Gleichgewichte unter dem Einfluß derselben Fermente, welche die Oligosen zerlegen, waren weitere Ergebnisse von allgemeiner Wichtigkeit nicht mehr zu erwarten. Von den Einzelproblemen des Hauptwerkes sind die meisten jetzt noch offen; nur bei der Synthese der Saccharose durch Enzyme wissen wir jetzt wenigstens, warum alle Versuche gescheitert sind, sie durch Enzyme zu bewirken; aber

auch hier ist trotzdem die Synthese aus am-Fructose + Glucose noch nicht sicher gelungen. Wir haben hier also im Wesentlichen nur Einzelheiten zu ergänzen.

Synthetische Bildung von Holosiden. Die Frage, was für **Glucoside** entstehen, wenn man Gleichgewichtsglucose mit Hefenenzymen behandelt, ist immer noch nicht geklärt. Daß eine α-Glucosidase, wohl sicher Maltase, Maltose erzeugt, wird nach PRINGSHEIM's und ISAIEV's **48a)** Feststellung nunmehr angenommen. SUZUKI **49)** hat nochmals darauf hingewiesen, daß die alte Annahme ARMSTRONG's (H.W. S. 534), daß Maltase „Isomaltose" bilde, auf einem Gehalt seines Präparates an β-Glucosidase beruht hat.

Aber das Gemisch der β-Holoside ist immer noch nicht aufgelöst. PRINGSHEIM **50), 51)** gibt an, daß Enzyme aus Unterhefen, hier also Gentiobiase, (ebenso wie Emulsin) Gentiobiose bilden, während Bäckerhefen wieder die unklare HILL'sche Revertose erzeugen, die PRINGSHEIM als der alten FISCHER'schen „Isomaltase" sehr nahestehend betrachtet, während GEORG und PICTET **52)** auch diese für verschieden halten (§ 335).

Über Disaccharid-Synthesen aus Glucose + Enzym unter der adsorbirenden Wirkung von Tierkohle s. PRZYLECKI **53)**. Sie werden um ca. 50 % beschleunigt, aber nur an der Oberfläche der Kohle, und nur in langen Zeiten (2—5 Monate). Die Beschleunigung rührt daher, daß die Kohle das Disaccharid stärker adsorbirt, als die Glucose.

Eine biochemische Synthese von Lactose durch ein Enzym der lactirenden Milchdrüse (Kühe) beschreibt MICHLIN **54)**. Sie gelingt nur, wenn man die Komponenten in sehr hoher Konz. (50 %ige Lösung) aufeinander wirken läßt; anderenfalls verschwindet die Glucose zu schnell durch Glykolyse. Das Gleichgewicht liegt zwischen 12 und 30 %, die Einstellung dauert 7—10 Tage. Nachher geht es wieder zurück.

Vielleicht erklärt sich so der Misserfolg SVANBERGS **55)**, der nur ein einziges Mal, aber nicht reproducirbar, eine Milchzuckersynthese durch die Brustdrüse erzielen konnte, trotzdem diese Lactase enthielt. Bildung eines reducirenden Disaccharids, das vielleicht Lactose ist, durch Trockenpulver lactirender Milchdrüsen (Ratten) WEINBACH **56)**.

Mit diesem Nachweis einer direkten Synthese ist die Theorie RÖHMANN's von „Stereokinasen" in der Brustdrüse (H. W. S. 539) noch unwahrscheinlicher geworden, die auch KLEINER c. s. **57)** nicht bestätigen konnten. Allerdings fanden sie außer Maltase überhaupt kein Enzym, so daß ihr Ergebnis auch dem von MICHLIN entgegengesetzt ist. Im übrigen sind wahrscheinlich auch die genannten Enzymsynthesen keine genügenden Modellreaktionen, da wahrscheinlich die vitale Synthese der Lactose über phosphorylirte Zucker erfolgt.

Eine Synthese von Raffinose aus Saccharose + Galactose durch Emulsin gibt BLAGOVESCHENSKI **58)** an. Als Medium 80 %-igen Aceton. Nach 5 Monaten bei 35° läßt sich eine

---

48a) ***V. J. Isaiev***, Yeast maltase. Jl. of Inst. Brewing **32**, 552 (1926). S.A. — 49) ***B. Suzuki, T. Maruyama***, Revers. of enz. act. Proc. Imp. Acad. Tokyo **3**, 533 (1927), BPh **44**, 822. — 50) ***H. Pringsheim, J. Leibowitz***, Revers. Synth. I. Ber. Chem. Ges. **57**, 1576 (1924). — 51) ***H. Pringsheim, J. Bondi, J. Leibowitz***, Revers. Synth. II. Ber. Chem. Ges. **59**, 1983 (1926). S.A. — 52) ***A. Georg, A. Pictet***, Isomaltose. Helv. Ch. A. **9**, 612 (1926). S.A. — 53) ***St. J. Przylecki, W. Giedroyć, E. A. Sym***, The systems glucose-enz. etc. Biochem. Jl. **22**, 811 (1928). S.A. — 54) ***D. Michlin, M. Lewitow***, Synth. von Lactose in der Milchdrüse. Bioch. Zs. **271**, 448 (1934). — 55) ***O. Svanberg***, Enzym. Vers. mit Milchdrüsen. Zs. phys. Chem. **188**, 207 (1930). — 56) ***A. Weinbach, D. B. Calom***, In-vitro-Synth. of non ferm. red. mat. by mammary gland. Amer. Jl. Phys. **109**, 108 (1934), BPh **83**, 197. — 57) ***J. S. Kleiner, H. Tauber***, Enz. of mammary gland. Jl. of biol. Chem. **99**, 241 (1932). — 58) ***A. V. Blagoveschenski***, Enzym. Synth. of raffinose. Biochem. Jl. **24**, 1337 (1930).

kleine Menge Kristalle isoliren (etwa 1 %), die er für Raffinose hält. $[\alpha]_D = + 95{,}60°$ (Raffinose 104°), Emulsin zerlegt wieder.

Die biochemische Synthese von **Saccharose** konnte nicht gelingen, so lange man von n-Fructose ausging, da S. nunmehr als ein Derivat der Fructofuranose erkannt ist. (Auch die rein chemische Synthese scheint bisher an der Ausbildung verschiedenartigster Gleichgewichte zu scheitern, vgl. Irvine § 308.)

Einen gewissen Erfolg wollen Oparin c. s. **59)** erzielt haben, indem sie die Umwandlung von am-Fructose in n-Fructose durch Zusatz von Phosphat und Phosphatase zu hemmen versuchen. Sie erhielten aus Invertzucker in 50 %-iger Lösung mit $KH_2\,PO_4$ und einem Fermentpräparat aus hochwertiger Saccharase + Phosphatase eine Biose mit den Eigenschaften der Saccharose, aber ein direkter Nachweis im überschüssigen Invertzucker ist nicht möglich. — Die ganze theoretische Grundlage der Versuche ist hinfällig. Die Autoren glauben nämlich, daß die aus Saccharose-PhS freiwerdende am-Fructose-PhS beständiger ist als die freie am-Fructose. In Wirklichkeit aber zerfällt, wie Neuberg **60)** bereits 1925 festgestellt hat, Saccharose-PhS durch Saccharase in Glucose-PhS und freie Fructofuranose, die sich sofort in Fructopyranose umlagert. — Lebedew **61)** konnte die Versuche von Oparin nicht reproduciren.

§ 305. Synthese von Heterosiden. Allgemein sei vorausgeschickt, daß es nach Bertrand **62)** möglich ist, durch Emulsin eine totale Hydrolyse von Salicin zu erzielen, sogar bei nicht unerheblichen Konzentrationen. Es tritt grade wie bei der Säurehydrolyse kein Gleichgewicht auf, und die Spaltprodukte hemmen nicht. Auch beim Phenol-β-glucosid liegt nach Josephson **63)** das Gleichgewicht fast völlig auf der Seite der Spaltung, die Synthese ist wenn überhaupt nur sehr schwach nachweisbar.

Josephson **63)** hat die synthetische Wirkung von β-Glucosidase aus Emulsin auf Glucose + Methanol kinetisch untersucht. Die Geschwindigkeit der Synthese ist der Enzymkonz. proportional. Die ph-Aktiv.-Kurve ist die gleiche wie bei der Hydrolyse. Die Affinitätskonstante Glucose-Enzym ist unabhängig von der Konz. und bei homologen niederen Alkoholen von der Natur des Alkohols. Die Konstante ergibt fast denselben Wert, wie er aus Hemmungsversuchen bei der Hydrolyse gefunden worden ist. Methylalkohol hemmt etwas, Synthese ebenso wie Spaltung.

Einige unwesentliche neue Beobachtungen zur Synthese des Propyl-β-glucosids, Abhängigkeit der Ausbeute von Temp., Alkoholmenge, Enzymmenge Gollan **64)**.

Neue biochemische Synthesen von Glykosiden:

β-Glucoside: 1, 3 Butylen-glykol, $CH_3 . CHOH . CH_2 . CH_2\,OH$, von Vintilesco **65)**; er erhielt das Mono-glucosid an der primären Alkoholgruppe. Keine Bevorzugung eines der optischen Antipoden. — Glykol-monoäthyläther **65a)**. — Allylalkohol Olive **66)**; am besten bei hoher Konz. des Alkohols, 90 %, und 50°. Weisse Kristalle, $[\alpha]_D = - 42°$. — Glycerol-glucoside: ein Gemisch von α- und β-Glucosiden erhielt bei Gegenwart von etwas HCl (bis 3%) aus Glycerol + Glucose Gilchrist **67)**. — d-Mannitol (**65a)**). — β-Glucoside von Cyclopentanol und Cyclohexanol durch Mandelemulsin in wäss. Aceton (Vintilesco **68)**).

---

59) ***A. Oparin, A. Kurssanow,*** Enz. Synth. des Rohrzuckers. Bioch. Zs. **289**, 1 (1931). — 60) ***C. Neuberg, S. Sabetay,*** Enzym. Spalt. der Saccharose-PhS. Bioch. Zs. **162**, 479 (1925). — 61) ***A. Lebedew, A. Dikanowa,*** Enzym. Rohrzuckersynth. Zs. phys. Chem. **231**, 271 (1935). — 62) ***G. Bertrand, A. Compton,*** La soi-dis. revers. des act. diast. Ann. Inst. Pasteur **39**, 355 (1925). — 63) ***K. Josephson,*** Synthet. Wirk. der β-Glucosidase. Zs. phys. Chem. **147**, 155 (1925). — 64) ***J. Gollan,*** Act. synth. de l'émulsine. Bull. Soc. Chim. Biol. **13**, 403 (1931). — 65) ***J. Vintilesco, N. Joanid,*** Synth. bioch. du β-gluc. du glycol butyl. Bull. Soc. Chim. Biol. **14**, 1228 (1932). — 65a) ***J. Vintilesco c.s.,*** Bioch. Synth. einiger Glykoside. Bull. Soc. Chim. Rom. **16**, 151 (1934), Ch. Cbl. **1935**, II, 868. — 66) ***M. Olive,*** Act. synth. de l'émuls. Bull. Soc. Chim. Biol. **13**, 254 (1931). — 67) ***H. S. Gilchrist, Cl. B. Purves,*** Glycerol glucoside. Jl. of Chem. Soc. **127**, 2735 (1925). — 68) ***J. Vintilesco, C.-N. Jonesco,*** Synth. bioch. des β-Cyclopentyl- et β-Cyclohexylgluc. Jl. de Pharmac. Chim. (8) **21**, 241 (1935).

Halogenirte Salicyl-β-glucoside mit der Glucose am phenolischen Hydroxyl (DELAUNEY **69**)); so 5-Chlor-salicyl-β-glucosid aus 5-Chlor-saligenin und Glucose in wäss. Aceton; entsprechend 5-Brom- und 5-Jod-salicyl-β-glucosid.

α-Mannoside haben HÉRISSEY c. s. **70**),**71**) durch Emulsin mit Hilfe der nunmehr von HELFERICH als specifisch erkannten α-Mannosidase (Luzernensamen) dargestellt, und zwar mit Glykol, Glycerin, Methyl-, Propyl-, Butylalkohol; Propanol 2 langsamer als Propanol 1.

β-Galactoside. Nach HAUSMANN **72**) ist der ph auf die Ausbeute (im höchsten Fall 63 %) von Äthyl-β-galactosid ohne Einfluß, wohl aber auf die Bildungs-geschwindigkeit; optimal = 5,0 wie für Spaltung.

l-α-Arabinoside: Die l-α-Arabinose ist nach HELFERICH (l. c.33) konfigurativ der β-d-Galactose entsprechend. Diese Arabinoside werden schwach durch Emulsin gespalten. Es gelingt aber auch die Synthese: mit Mandelemulsin + Äthylalkohol. Durch Anwendung (bei 33°) von 95%igem Alkohol gelang Reindarstellung des ersten biochemisch dargestellten Pentosids; es ist ausnahmsweise rechtsdrehend, da es eben α ist: $[\alpha]_D = + 9{,}95$ (BRIDEL **73**)).

IV. Allgemeines über Darstellung und Untersuchung der Wirksamkeit.

§ **307**. Da die Methodik der Carbohydrasen im Hauptwerk Bd. III erschöpfend behandelt ist, im übrigen ein genaueres Eingehen auf die Methodik nicht im Plane dieses Ergänz. Werkes liegt, so sollen hier nur einige Hinweise auf neue Arbeiten zur Methodik gegeben werden; s.a. GRASSMANN **74**).

Zur generellen Trennung der Oligasen: KRITSCHEWSKAJA **74a**) gibt an, daß aus WILLSTÄTTER-Adsorbaten (Tonerde, $Fe(OH)_3$) oder Fällungen mit Uranylacetat durch Lösungen der betr. Substrate streng specifisch eluirt werden können: Saccharase, Maltase, β-Glucosidase; Lactase nicht; sie ist aber wie die anderen in adsorbirtem Zustande wirksam. Kohle adsorbirt Saccharase und Maltase wirksam, Elution nicht möglich; β-Glucosidase, Lactase im Kohleadsorbat unwirksam. Objekt: Blüten und Blätter von *Convallaria majalis*.

Einfache qualitative Prüfung auf Rohrzuckerspaltung, Nachweis der Fructose durch die ECKERT'sche Probe (KERTÉSZ **75**)). Das Reaktionsgemisch wird auf festes NaOH gebracht, bei Anwesenheit von Fructose rotbraune Färbung, die Saccharose nicht gibt. Wenn also nach 24 h Brutschrank nunmehr positive Probe, so ist Fructose enzymatisch gebildet. Verwendung des Eintauch-Refraktometers anstatt Polarimeter bei trüben und gefärbten Mischungen GORBACH **76**). Besonders wertvoll ist, daß man nicht (zur Einstellung des α, β-Gleichgewichtes) Soda zuzusetzen braucht.

Dilatometrische Messungen bei der Spaltung von verschiedenen Oligosen, sowie der Methylglucoside RONA **77**). Die Abnahme je Millimol erwies sich als unabhängig von den Konzz. von Substrat und Enzym, derselbe Wert bei Säurehydrolyse:

---

69) ***P. Delauney***, Synth. bioch. d'un glucos. halog. etc. C. R. **188**, 990, **185**, 1530, **191**, 57, **197**, 70 (1926—33). — 70) ***H. Hérissey***, Reversib. de l'act. ferm. de la α-mannos. Bull. Soc. Chim. Biol. **5**, 501 (1923). — 71) ***H. Hérissey, J. Cheymol***, Act. synth. de la d-mannosidase α etc. C. R. **178**, 1372, Jl. de Pharmac. Chim. **29**, 441. Bull. Soc. Chim. Biol. **6**, 186, 865 (1924). — 72) ***M. Hausmann jr.***, Synth. de l'éthylgalact. C. R. Soc. Phys. Genève **44**, 94 (1927). — 73) ***M. Bridel, C. Béguin***, Synth. bioch. . . . de l'éthyl-arabin. α. C. R. **182**, 659, 812. Bull. Soc. Chim. Biol. **8**, 469 (1926). — 74) ***W. Grassmann***, Meth. und Ergebn. der Enzymforsch. München 1928. — 74a) ***E. J. Kritschewskaja***, Spez. Elution von Ferm. Bioch. Zs. **272**, 348 (1934). — 75) ***Z. J. Kertész***, Qualit. Saccharaseprobe. Bioch. Zs. **209**, 492 (1929). — 76) ***G. Gorbach***, Verw. des . . . Eintauchrefrakt. etc. Bioch. Zs. **217**, 440 (1930). — 77) ***P. Rona, N. Neuenschwander-Lemmer, (H. Fischgold)***, Dilatom. Unt. bei Ferm. Proz. Bioch. Zs. **235**, 214, **247**, 257, **254**, 322 (1931/32). S.A.

Abnahme je Millimol in cmm

Saccharose	6	Lactose	4,2
Maltose	3,1	Cellobiose	4,2
Raffinose (Emulsin) .	4,04	α-Methylglucosid	0.67
Raffinose (Saccharase)	6.5	β-Methylglucosid	1.69

Da sich bei der Mutarotation der Glucose eine kleine Volumzunahme ergibt, so sind diese Werte unter Berücksichtigung der Mutarotation mit einer kleinen Korr. zu versehen, die z. B. bei Saccharose 0,25 beträgt, also wahre Abnahme 6,25. — Gute Übereinstimmung mit den durch Bestimmung der Dichte gefundenen Werten von RIIBER für das molekulare Lösungsvolumen. Dilatometrische Messung der Maltose-bildung aus Stärke § 377.

Es sei hier noch ein Vorschlag WEIDENHAGEN's 78) wiedergegeben, bestimmte Regelmässigkeiten bei der Wirksamkeitsbestimmung der Oligasen festzusetzen, um die verschiedenen Enzyme mit einander vergleichen zu können. Ich citire wörtlich nach seiner Darlegung (l. c. 2, S. 450).

Es wird vorgeschlagen, in Anlehnung an die von WILLSTÄTTER bei der Maltosespaltung benutzten Werte als „Normalbedingungen" festzulegen, wenn 2,500 g Maltose oder die äquivalente Menge eines anderen Substrates bei optimalem ph und 30° in 50 ccm Gesamtvolumen mit einer Glykosidase behandelt werden. Als Zeitwert soll die Zeit in Minuten bezeichnet werden, in der 1 g Enzymmaterial die 50 %ige Spaltung des Substrates unter Normalbedingungen bewirkt. Die Enzymeinheit wird definiert als die Enzymmenge in 1 g Substanz vom Zeitwert 1. Als Enzymwert soll immer die Zahl der Enzymeinheiten in einem Gramm Trockensubstanz verstanden werden. Bei hochaktiven Präparaten werden bei der Berechnung des Zeitwertes infolge nicht immer streng erfüllter Proportionalität zwischen Zeit und Umsatz häufig Fehler auftreten. Doch scheint dieser Nachteil gering gegenüber dem Vorteil, wirkliche Vergleichsmöglichkeiten zu haben. Besonders bei schwach aktiven Präparaten wird es kaum möglich sein, weniger als 1 g Enzymmaterial unter Normalbedingungen zu verwenden. Gerade diese schwachen Präparate haben aber bei ihrer Auswertung häufig zu schwerwiegenden Irrtümern geführt nur aus dem Grunde, weil sie der Menge nach nicht mit dem Vergleichsenzym abgestimmt wurden. Die Tatsache, daß sich z. B. der β-Glucosidasegehalt der Hefe zu dem eines normal gereinigten Emulsinpräparates wie 1 : 10—20 000 verhält, mag zeigen, mit wie differierenden Konzentrationen man bei gleichem Enzym zu rechnen hat. In der folgenden Tabelle sind die Substratmengen verzeichnet, die bei „Normalbedingungen" in 50 ccm gelöst werden müssen. Dabei ist berücksichtigt, daß die Melecitose gleichzeitig zwei Bindungen zur Verfügung stellt. Beim Amygdalin ist ebenfalls nur die halbe äquivalente Menge eingesetzt, obwohl hier die Lösung der beiden Bindungen nacheinander erfolgt.

Maltose + H_2O	2,500 g	Cellobiose	2,375 g
Saccharose	2,375 g	Amygdalin + $3H_2O$	1,7743 g
Melecitose + $2H_2O$	1,875 g	Salicin	1,986 g
α-Methylglucosid	1,347 g	Lactose + H_2O...............	2,500 g
Raffinose + $5H_2O$	4,125 g	Melibiose + $2H_2O$	2,625 g

Bei Versuchen, die lediglich zum Vergleich der einzelnen Enzyme dienen sollen, ist es weiterhin zweckmäßig, von den möglichen Substraten ein besonders bequemes herauszunehmen und als „Standardsubstrat" zu verwenden.

Enzym	Standardsubstrat
α-Glucosidase	Maltose
β-Glucosidase	Salicin
α-Galactosidase	Melibiose
β-Galactosidase	Lactose
β-h-Fructosidase..............................	Saccharose

Über die Anwendung zur Saccharasebestimmung s. § 318.

78) ***R. Weidenhagen,*** Z. K. der β-Glucosidase. Zs. V. D. Zuck. **79,** 599 (1929).

B. Oligasen.

I. Fructosidasen, Fructosaccharasen.

1) Allgemeines.

§ 308. Die einzige bisher bekannte Fructosidase ist die klassische Invertase, das Invertin. Dieses Enzym setzt an der Fructosido-bindung der Saccharose an, ist eine Fructo-saccharase. Ob die dieser Gruppe zuzurechnenden Enzyme alle identisch sind in dem Sinne, wie man überhaupt von identischen Enzymen sprechen kann, ist eine noch offene Frage. Die der echten Hefen scheint überall dieselbe Saccharase zu sein, obgleich auch hier die Affinitäten zur Saccharose verschieden sind, und noch stärker die Verschiebungen der relativen Spezifität zwischen Saccharose und Raffinose mit den einzelnen Hefen wechseln. Aber ob alle Fructosaccharasen der anderen Mikroben dasselbe Enzym sind, ist eine bisher nicht zu beantwortende Frage. Wenn man alle diese Enzyme als Fructo-saccharase anspricht, so zeigen sie eben unter sich erhebliche Verschiedenheiten in bezug auf den opt. ph und andere Eigenschaften; aber eben dies ist überall noch nicht sicher und nicht aufzuklären, solange die ungelöste Frage der Existenz eines ganz anderen, ebenfalls Saccharose spaltenden Enzyms, der Gluco-saccharase die Dinge verwirrt (§ 299). Wir wollen vorläufig die Fructo-saccharasen als eine Einheit behandeln, was dadurch erleichtert wird, daß fast alle genaueren Erkenntnisse über Art und Wirkung des Ferments an dem Invertin der Hefe gewonnen sind.

Fructo-saccharase ist nach der inzwischen festgelegten Struktur der Saccharose eine am-Fructosidase (h-Fructosidase), da die Fructose im Rohrzucker eine alloiomorphe oder Hetero-fructose ist, mit $< 2,5 >$-Bindung, eine Fructo-furanose nach der Benennung von HAWORTH. Man kann sie sogar nach SCHLUBACH **79)** bereits genauer bezeichnen als eine β-h-Fructosidase, da sie aus dem Gleichgewicht der beiden Methyl-h-fructoside (α und β) nur die β-Form spaltet, α ganz unverändert läßt. Dieser Befund spricht auch für die meist angenommene Konfiguration der Fructose in der Saccharose selbst als β; jedoch ist dieser Schluß nicht unangefochten (s. u.).

Reines Methyl-n-fructosid wird nicht angegriffen; jedoch fand SCHLUBACH stets eine gewisse Spaltung, da die Präparate nicht unerhebliche Mengen des Methyl-h-fructosids enthalten; WEIDENHAGEN (l. c. 27) fand bei Methyl- und Phenol-fructopyranosiden garkeine Spaltung.

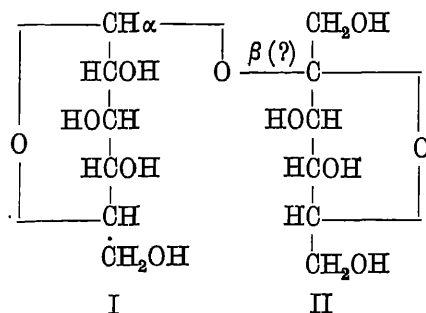
Als h-Fructosidase greift nun dieses Enzym auch andere natürliche Fructoside an, wenn sie eben h-Fructose gebunden enthalten. Nach KUHN (*l. c. 107*) und JOSEPHSON **80)** ist es dasselbe Enzym, das Raffinose, Gentianose, Stachyose, Verbascose

---

79) ***H. H. Schlubach, G. Rauchalles,*** Spalt. des γ-Methylfructosids etc. Ber. Chem. Ges. **58,** 1842 (1926). S.A. — 80) ***K. Josephson,*** Affin. der Sacch. Zs. phys. Chem. **186,** 62, **149,** 71 (1924/5).

spaltet; CHAUDUN 81) hat dies aus kinetischen Messungen bestätigt. In allen diesen Stoffen liegt also Fructo-furanose vor, der Angriff erfolgt an der Fructosido-bindung. Auch einige niedere Polylävane werden nach SCHLUBACH 82) durch Saccharase angegriffen. Dagegen ist die Angabe WEIDENHAGEN's (l. c. 27), daß auch die höheren Polylävane und insbesondere das Inulin, das ebenfalls ganz aus h-Fructose aufgebaut ist, durch Saccharase zerlegt werden, wahrscheinlich nicht richtig; für diese gibt es ein eigenes den Polyasen zugehöriges Enzym Inulase (GRASSMANN c. s., vgl. § 412).

Es ist möglich, daß auch eine α-h-**Fructosidase** existirt. In der Taka-saccharase fand SCHLUBACH auch eine Spaltung von α-Methyl-fructofuranosid; Hefe greift das reine α-Fructofuranosid nicht an (l. c. 98). Hierzu noch eine Beobachtung von MORGAN 83): er fand, daß Hefeninvertase einen α-Methyl-äther des Zymophosphats angreift, also α-Methyl-fructo-furanosido-di-phosphat, und zwar teilweise unter Abspaltung des Methyls; der entsprechende β-Äther wurde nicht von Hefe, aber auch nicht von Emulsin angegriffen.

Struktur der Substrate (84—86). Rohrzucker. Die Struktur der Saccharose ist in den Hauptzügen festgelegt, nachdem man schon lange gewußt hat, daß sie ein Fructosido-glucosid ist, d. h. daß beide reducirenden Gruppen C_1 resp. C_2 (der Fructose) miteinander gekuppelt sind. Die endgiltige Struktur ist

Saccharose besteht also aus Glucopyranose (I) in nicht reducirender Verbindung mit Fructofuranose (II); sie ist α-1-**Glucosido** < 1,5 > -2 β-**fructosid** < 2,5 >.

Der Nachweis der furoiden Natur des Fructoseteiles gelang HAWORTH c. s. 87), 88) hauptsächlich durch Darstellung und nähere Untersuchung der aus Oktamethyl-saccharose erhältlichen Tetramethyl-fructofuranose (HAWORTH 89)), die z. B. beim Abbau ein 2, 3, 5 Trimethyl-h-Arabonsäurelacton ergab; die Stellung C_6 war also frei, es konnte nicht Fructopyranose vorgelegen haben. — Synthese aus Tetraacetyl-fructofuranose + Tetraacetylglucose (PICTET 90)), Tetraacetyl-fructopyranose gibt ein Isomeres (91); von ZEMPLÉN 92) nicht

81) ***A. Chaudun***, Hydr. comp. des polysacch. etc. Bull. Soc. Chim. Biol. **15**, 1117 (1933). — 82) ***H. H. Schlubach, W. Flörsheim***, Polylaevane der Blätter etc. Zs. phys. Chem. **198**, 153 (1931). — 83) ***W. Th. J. Morgan***, α- and β-Methylhexoside-diphosph. acids. Biochem. Jl. **21**, 675 (1927). — 84) ***H. Vogel, A. Georg***, Atlas der Zuckerarten. Berlin 1931. — 85) ***W. N. Haworth***, Konstit. der Kohlenhydrate, dtsch. von HAGENBUCH. Dresden 1932. — — 86) ***K. Bernhauer***, Chemie und Bioch. der Zuckerarten. Berlin 1933. — 87) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst***, Struct. of ... sucrose. Jl. of Chem. Soc. **1926**, 1858. — 88) ***J. Avery, W. N. Haworth, E. L. Hirst***, Const. of the disacch. Sucrose. Jl. of Chem. Soc. **1927**, 2308. — 89) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst c. s.***, Const. of the disacch. Jl. of Chem. Soc. **1927**, 1513, 2432. — 90) ***A. Pictet, H. Vogel***, Synth. du sacchar. Helv. Chim. Acta **11**, 436, C. R. **186**, 724 (1927). — 91) ***Dies.***, Sacchar. C et D. Helv. Chim. Acta **11**, 905 (1928). — 92) ***G. Zemplén, A. Gerecs***, Synth. des Rohrz. Ber. Chem. Ges. **62**, 984 (1929).

bestätigt. Auch IRVINE c. s. 93) erhielten nur Isomere, darunter eine kristallisirende Isosaccharose, vielleicht mit der PICTETschen identisch.

Konfiguration der Saccharase. Daß die Glucosido-gruppe die Konfiguration α hat, ist längst bekannt. Dagegen ist die Konfiguration der Fructosido-gruppe auch heute noch nicht endgiltig geklärt, wenn man im Allgemeinen auch mehr zur Annahme von β neigt.

Früher hatte man meist α angenommen. HUDSON hatte aus den optischen Werten berechnet, daß die erste entstehende Fructose-form etwa + 17° dreht, und folgerte daraus, daß es α sein müsse; er nahm aber damals natürlich n-Fructose an, ebenso HAWORTH und MORGAN. Nach SCHLUBACH 79) ist aber eben diese Fructose-form mit + 17° die β-Fructo-furanose, so daß also diese in der Saccharose selbst gebunden ist. Er folgert dies auf grund seiner Beobachtung, daß der spaltbare Anteil eines Gemisches von α und β-Fructofuranosid — 17° dreht, daß also die Fructofuranose selbst nur schwach rechtsdrehend sein kann, nach seiner Berechnung eben + 17°.

IRVINE 93) kommt jedoch aus Strukturbetrachtungen zu einem anderen Ergebnis. Er hat synthetisch (s. o.) eine Isosaccharose dargestellt, die nach der Synthese β-Glucosido-β-fructosid sein soll; ein weiteres nicht isolirtes Isomeres hält er für α-Glucosido-β-fructosid. Daraus und aus optischen Werten folgert er für Saccharose selbst die Struktur eines β-Glucosido-α-h-fructosids. Nach GEORG 94) ist aber diese PICTET-IRVINE'sche Isosaccharose β-Glucosido-α-fructo-furanosid, ebenfalls nach optischen Werten. Diese Isosaccharose wird von reiner Saccharase nicht angegriffen, wohl aber von Invertase aus *Aspergillus*. Sie scheint nur von β-Glucosidase, aber auch nur schwach, angegriffen zu werden. Neuere Versuche von IRVINE 95) zeigen auch nur, daß Isosaccharose ebenso wie Saccharose aus n-Glucose und am-Fructose besteht, sagen aber nichts über die Konfiguration aus.

Auf einem anderen Wege kommt BERNER 96) zu der Annahme einer Konfiguration α. Er erhielt bei der direkten Spaltung von Saccharose mit der 10-fachen Menge Methanol Glucose und ein rechtsdrehendes Methyl-fructosid (mindestens + 54°), das sich bei längerem Erhitzen in normales linksdrehendes Methyl-fructosid umlagert. Nach der HUDSONschen Regel wäre also dies Fructosid α, und wenn es tatsächlich das genuine Spaltprodukt ist, so wäre die Fructose im Rohrzucker mit der Drehung von + 15° α-am-Fructose, und somit Saccharose ein α-Fructo-furanosid. BERNER bezweifelt die Geltung der Drehzahlen von SCHLUBACH, indem er annimmt, daß die β-am-Fructose linksdrehend sein muß. Nach ihm (97) soll auch Inulin aus α-Fructofuranose aufgebaut sein.

GEORG 94) schließt aber im Gegensatz zu BERNER aus seiner für Isosaccharose angegebenen Struktur, daß Saccharose doch die Konfiguration eines α-Glucosido-β-Fructofuranosids hat, und die BERNER'schen Ergebnisse umgekehrt dahin zu deuten sind, daß bei der Alkoholyse bereits eine WALDEN-Inversion stattfindet. Ferner haben PURVES und HUDSON 98) nunmehr das reine kristallisirte α-Methyl-fructofuranosid dargestellt, das bei einem $[\alpha]_D$ von + 93° nicht durch Saccharase angegriffen wird.

Daraus folgern sie, daß dieses rechtsdrehende Produkt nicht dem im Rohrzucker gebundenen Fructosekern entspricht, daß das durch Saccharase spaltbare Methyl-fructofuranosid linksdrehend ist, und zwar $[\alpha]_D^{20} = -52°$.

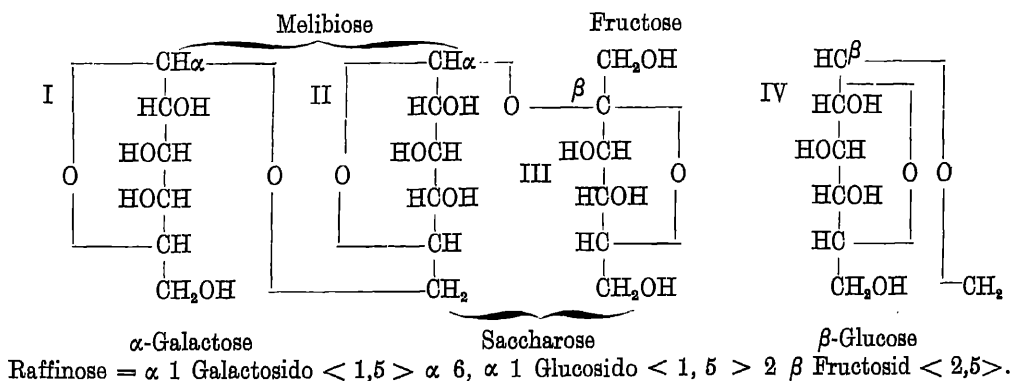
Durch Methylirung von Fructose unter bestimmten Bedingungen wird ein Gemisch mehrerer Stoffe erzielt, in der Hauptsache bestehend aus diesem linksdrehenden, spaltbaren, und

93) ***J. C. Irvine c. s.***, Condens. of glucose and fruct. Jl. Amer. Chem. Soc. **51**, 1279 (1929). — 94) ***A. Georg***, Config. de l'isosacch. etc. Helv. Chim. Acta **17**, 1566 (1934). — 95) ***J. C. Irvine, D. Routledge***, Isomer. of sucrose and isosucr. Nature **1934**, 143 (1934). — 96) ***E. Berner***, Alkoholyse des Rohrzuck. Ber. Chem. Ges. **66**, 1076 (1933). — 97) ***E. Berner***, Alkoholyt. Abbau des Inulins. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG) **505**, 58 (1933). — 98) ***C. B. Purves, C. S. Hudson***, Anal. of γ-methylfruct. mixt. by . . . invertase. Jl. Amer. Chem. Soc. **56**, 702, 708, 1969, 1973 (1934).

einem rechtsdrehenden unspaltbaren Methylfructofuranosid, mit $[\alpha]_D = + 93,05°$. Dieses ist kristallisirt erhalten worden, das linksdrehende nicht. Wendet man das gleiche Verfahren (HCl-Methanol) auf Saccharose an, so erhält man 60 % der Gesamtfructose als das linksdrehende, spaltbare Methylfructofuranosid. Dies scheint also das primäre Spaltprodukt zu sein, das direkt aus Saccharose entsteht, nicht erst über freie Fructose: Saccharose + CH_3OH → Glucose + Methyl-fructofuranosid. Und dies lagert sich dann erst zu einem Gleichgewicht mit dem kristallis. rechtsdrehenden Fructosid um. Danach kann man wohl annehmen, daß dieses stark linksdrehende Fructosid der Konfiguration nach der Fructose im Rohrzucker selbst entspricht, da nur dieses von Invertase gespalten wird.

Damit durfte wohl mit sehr großer Wahrscheinlichkeit die Konfiguration der Saccharose als eines β-Fructofuranosids festgelegt sein.

Raffinose ist je nach Lösung der Bindung spaltbar in Fructose + Melibiose (Saccharase) oder Galactose + Saccharose (Emulsin durch die Galactoraffinase). Daraus folgt zunächst die Hauptstruktur einer Galactosido-saccharose, wobei die Galactose an der Glucose ansetzt. Da Melibiose eine α-Galactosido-6-glucose ist (§ 331), so ergibt sich folgende genaue Struktur (HAWORTH c.s. **99)**, **100)**).

Raffinose = α 1 Galactosido < 1,5 > α 6, α 1 Glucosido < 1, 5 > 2 β Fructosid < 2,5>.

Synthese von VOGEL und PICTET **101)** aus Galactose oder α-Galactosan durch Schmelzen mit Saccharose.

Gentianose ist vollkommen analog gebaut, enthält aber anstatt der α-Galactose eine β-Glucose. Durch Saccharase wird mithin die Glucosidoglucose Gentiobiose frei: β 1-Glucosido-6-glucose, durch Gentiobiase (resp. Amygdalase, § 299) Saccharose neben β-Glucose. In der obigen Formel ist also nur anstatt der α-Galactose eine β-Glucose zu setzen (IV).

Über die Zerlegung eines Dilaevans aus den Blättern von *Yucca filamentosa* durch Hefenenzyme s. SCHLUBACH (l. c. 82). Auch Polylaevane aus Topinambur und Gramineen werden nach COLIN **103)** z. T. zerlegt, viele andere nicht.

Über das Tetrasaccharid Stachyose (Galactose—Galactose—Glucose—Fructose) liegen neue Untersuchungen nicht vor (H. W. S. 544).

Die Zerlegung der ebenfalls Fructose gebunden enthaltenden **Turanose** (α-Glucosido-am-Fructose) und des darauf aufgebauten Trisaccharids **Melecitose** (Glucose—Fructose—Glucose) durch Enzyme der Hefen etc.) ist sehr wahrscheinlich nicht der eigentlichen

99) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, D. A. Ruell,*** Const. of raffinose. Jl. of Chem. Soc. **123,** 3125 (1923). S.A. — 100) ***W. Charlton, W. N. Haworth c. s.*** Melibiose and its rel. to raff. ebd. **1927,** 1527, 3146. — 101) ***H. Vogel, A. Pictet,*** Synth. du raffinose. Helv. Chim. Acta **11,** 898 (1928). — 103) ***H. Colin, A. de Guignac,*** Divers types de graminées etc. C. R. **182,** 1637 (1926).

Invertase, der Fructosidase zuzuschreiben, sondern einer α-Glucosidase. Diese Frage ist untrennbar verknüpft mit dem Problem, ob es eine besondere Glucosaccharase gibt (KUHN), oder ob diese mit der allgemeinen α-Glucosidase (WEIDENHAGEN) zusammenfällt. Wir haben dies principiell §§ 299, 300 besprochen und werden auf Einzelheiten noch § 321 zurückkommen.

Es sei also hier nur nochmals mit R. KUHN **104)** betont, daß die eigentliche Fructosaccharase diese Stoffe, in denen die Fructose eine andere Bindung hat als im Rohrzucker, nicht angreift. Es muß genau dieselbe Bindung sein, denn auch Turanose wird nicht angegriffen; oder richtiger, sie wird von einer α-Glucosidase angegriffen (§ 299, 300); einen Versuch mit reiner Turanose und reiner Fructosaccharase habe ich nicht aufgefunden. Wenn PACSU **105)** mit seiner neuen Turanoseformel (5 Glucosido-fructopyranose) Recht hat, daß sie keinen Furanosering enthält, vielmehr die Fructose $< 2{,}6 >$ oder in Lösung $< 2{,}4 >$ ist, so wäre ja die Nicht-Affinität dieser Zucker zur β-h-Fructosidase zu verstehen. Dagegen spaltet Fructosaccharase alle Stoffe, bei denen die α-Glucosegruppe der Saccharose irgendwie verändert ist (soweit solche dann überhaupt noch spaltbar sind), also außer Raffinose und Gentianose auch z. B. Saccharose-Phosphat (Hesperonal), was mit reiner Hefeninvertase zuerst NEUBERG **106)** gefunden hatte; es entsteht n-Fructose und Glucose-PhS. Saccharose-PhS wurde aber auch von Takasacch. gespalten, vielleicht enthielt das Präparat PhS an der Fructose (OHMIYA **107)**).

Es besteht überhaupt keine Affinität zwischen Saccharase und α-Glucose, wie aus den Hemmungserscheinungen hervorgeht. Auf diese, die recht komplicirt sind, kommen wir § 320 eingehender zurück.

2) Vorkommen und Bildung.

§ 309. Vorbemerkung. Die unentschiedene Frage, ob es für die Saccharosespaltung zwei ganz verschiedene Enzyme gibt, nämlich die echte Fructosidase, und eine ebenfalls Saccharose angreifende α-Glucosidase, mag diese nun die ganz allgemeine sein oder eine besondere „Glucosaccharase", macht auch heute noch die Beschreibung des Vorkommens schwierig; denn entweder wird auch in neueren Arbeiten einfach Rohrzuckerspaltung angegeben, oder aber die Diagnose, ob Angriff an der Fructose oder Glucose, ist bestritten. Die wesentlichen Hilfsmittel zur Entscheidung sind die Untersuchungen an Trisacchariden: spaltet ein Enzym Raffinose und Gentianose, so ist es die Fructosidase, spaltet es Melecitose, die Glucosidase. Aber grade diese Fähigkeiten werden vielfach umstritten, entweder weil sich wirklich die biologischen Quellen (Hefen, Schimmelpilze) verschieden verhalten, oder weil andere Enzyme das Bild trüben, besonders Melibiase, die ja ebenfalls Raffinose (an der Galactosido-gruppe) angreift. Es sind hier noch sehr viele Unklarheiten vorhanden.

Wir können nur so vorgehen, daß wir die beiden Saccharose spaltenden Enzyme hier aussondern, die mit der größten Wahrscheinlichkeit Glucosaccharasen sind: die Saccharase der Taka (*Aspergillus oryzae*) und die S. der höheren Tiere. Die anderen werden wir hier behandeln. Die der Hefen ist sicherlich ganz überwiegend

---

104) ***R. Kuhn, H. Münch,*** Gluco- und Fructosaccharase. Zs. phys. Chem. **150**, 220, **163**, 1 (1925/7). — 105) ***E. Pacsu,*** Const. of melec. and turan. Jl. Amer. Chem. Soc. **53**, 3099 (1931). — 106) ***C. Neuberg, S. Sabetay,*** Enz. Spalt. der Sacchar.-PhS. Bioch. Zs. **162**, 479 (1925). — 107) ***S. Ohmiya,*** Hydrol. der Hexosid-PhS. Jl. of Biochem. **18**, 125 (1933). S.A.

Fructosidase, wenn auch Glucosaccharase vorzukommen scheint (§ 321); die der Phanerogamen behandeln wir hier, weil über ihre feinere Spezifität nichts bekannt ist, und schließlich geben wir noch hier einige Angaben über S. bei Wirbellosen, da bei diesen gelegentlich auch Spaltung von Raffinose und Gentianose beobachtet ist. Daß diese Aufteilung eine provisorische ist, braucht nicht betont zu werden.

a) Saccharase der Hefen.

Die fast allgemeine Verbreitung der S. in allen Arten echter Hefen und ihren nächsten Verwandten ist immer wieder bestätigt worden.

Zu den wenigen Ausnahmen gehört wie lange bekannt *Schizosacch. octosporus*. Das Fehlen von Saccharosespaltung bei frischer Hefe und Autolysesaft ist erneut bestätigt. Dagegen scheint der Zellrückstand Glucosaccharase zu enthalten (Hofmann **108**)). Weitere Ausnahmen sind einige Arten von *Pseudosaccharomyces* *), *Hanseniaspora, Saccharomycopsis*, die Rohrzucker nicht angreifen; sie sollen industriell benutzt werden, um aus Endmelassen die freigesetzten Monosen zu vergären und so die Gewinnung des Rohrzuckers zu erleichtern (**109**).

Die im Weinmost gefundene S. stammt z. T. schon aus den Trauben, jedoch ist im Jungwein der Hauptteil Hefensaccharase; der Gehalt ist anfangs sehr hoch, verschwindet aber bei ca. fünfjährigen Weinen (**110**).

§ 310. Verhalten der Saccharase in den Zellen. Wir konnten im H. W. S. 546 noch grade über den Beginn der Untersuchungen Willstätters berichten, die sich mit dem Zustande der Saccharase in den Hefezellen befassen, und die seither fortgesetzt worden sind (**111—124**)) **). Der Hauptsachverhalt ging schon aus den ersten Arbeiten hervor, daß nämlich die S. in der Zelle nicht irgendwie fest gebunden ist, sondern frei gelöst. Sie wird nur durch rein mechanische Hindernisse festgehalten, nämlich durch undurchlässige Zellwände. Wenn man diese abbaut, wird das Enzym frei. In der Abh. II (**112**) drückt W. dies wie folgt aus:

„*Es* (*das Enzym*) *ist nicht oder nur locker an Bestandteile des Zellinhalts oder der Zell-*

---

*) Anm. *Pseudosaccharomyces Klöcker* ist als Genus an die Stelle der früheren Art *Sacch. apiculatus Reess* getreten.

**) Anm. Im H.W. sind die Arbeiten Willstätter's c.s. dadurch zerstreut, daß sie z. T. erst bei der praktischen Darstellung der S. (§ 315) zitiert sind. Wegen der prinzipiellen Bedeutung dieser Zusammenhänge gebe ich hier die ganze Reihe wieder, unter Wiederholung der bereits im H.W. zitierten Arbeiten.

108) ***E. Hofmann,*** Maltase und Sacch. bei Schizosacch. octosp. Bioch. Zs., **272**, 417 (1934). S.A. — 109) ***V. Birckner, H. S. Paine,*** Invertase-free yeasts etc. Ind. Eng. Chem., **20**, 267 (1928). — 110) ***C. v. d. Heide c.s.,*** Vork. von Saccharase in Most und Wein. Zs. Unt. Lebensmittel, **57**, 13 (1929). — 111) ***R. Willstätter,*** Untersuch. über Enzyme, Bd. I, S. 535, Berlin 1928. — 112) ***R. Willstätter, F. Racke,*** Invertin I, II. Ann. Chem. Pharm. (Liebig), **425**, 1; **427**, 111 (1921). — 113) ***R. Willstätter, R. Kuhn,*** Elution von Sacch. und Maltase. Zs. phys. Chem., **116**, 53 (1921). — 114) ***Ders., Joh. Graser, R. Kuhn,*** Invertin III. ebd. **123**, 1 (1922). — 115) ***Ders., W. Wassermann,*** Invertin IV. ebd. **123**, 181 (1922). — 116) ***Ders., K. Schneider,*** Invertin V, VIII. ebd. **133**, 193 (1924); **142**, 257 (1925). — 117) ***H. Kraut, E. Wenzel,*** Enzymadsorpt. (Invertin VI, VII). ebd. **133**, 1 (1924); **142**, 71 (1925). — 118) ***R. Willstätter, Ch. D. Lowry, K. Schneider,*** Invertin IX. ebd. **146**, 158 (1925). — 119) ***Ders., K. Schneider, E. Bamann,*** Invertin X. ebd. **147**, 248 (1925). — 120) ***Ders., Ch. D. Lowry,*** Invertin XI. (Vermind. in der Hefe). ebd. **150**, 287 (1925). — 121) ***Ders., K. Schneider, E. Wenzel,*** Invertin XII. ebd. **151**, 1 (1926).

wand adsorbirt, ... aber durch eine mechanische Einrichtung, durch einen örtlichen Schutz, vor der Diffusion völlig geschützt."

„*Das Invertin verläßt weder die lebende, noch die abgetötete Hefezelle, solange ihre Membran nicht abgebaut ist*".

Saccharase hat also in dieser Beziehung einen ganz anderen Typus, als die meisten anderen Enzyme, z. B. Lipase, Tryptase, vor allem Amylase. Diese treten entweder als Lyo-enzyme auf, d. h. sie sind frei und lassen sich auch tatsächlich durch die üblichen Eingriffe wie Autolyse etc. freilegen. Oder sie sind Desmo-enzyme, d. h. sie sind in tatsächlicher chemischer Bindung an das Protoplasma verankert, werden auch nicht durch spontane Autolyse, sondern nur durch starke chemische Eingriffe frei. Wir kommen darauf genauer bei Amylase zurück (§ 376). Die S. ist also das, was man früher allgemein unter einem „**Endo-enzym**" verstanden hat: sie wird zwar von der gesunden Zelle mit intakten Umwallungen nicht abgegeben, steht also im Gegensatz zu den echt secernirten Fermenten; aber sie ist wie gesagt nicht fest gebunden und geht aus der Zelle heraus, wenn man ihr durch Autolyse der Zellwand oder rein mechanisch Lücken schafft, durch die sie passiren kann.

WILLSTÄTTER **124)** (S. 41, 42) definirt die Unterschiede zwischen Desmo- und Endoenzymen wie folgt:

„*Die enzymatische Freilegung eines Endoenzyms, der Hefesaccharase, greift nicht den Enzymkomplex an, sondern die Zellmembran.*" „*Die enzymatische Freilegung eines Desmoenzyms ... beruht auf einer Spaltung des Enzymkomplexes selbst, dessen kolloider Träger einen teilweisen Abbau erleidet*".

Mit der Bindung als Endoenzym hängt die Tatsache zusammen, daß die Saccharase in allen ihren Phasen der Zellgebundenheit oder Freilegung dieselben Eigenschaften zeigt, es ist „*keine Abhängigkeit der Eigenschaften vom Zustand bekannt, kein Unterschied zwischen dem Enzym in der Zellmembran und dem in Lösungen, zwischen Endo- und Lyo-saccharase.*" „*Der Zucker diffundirt unbeschränkt zum Enzym, aber das Enzym vermag nicht durch die Poren der Membran hinaus zu diffundiren.*"

Ähnlich steht es mit der S. der anderen Mikroben, jedoch sind hier die Dinge nicht so exakt untersucht. (§ 322). Die Zerstörung dieser Wände kann im Prinzip ebensowohl durch eine gründliche mechanische Zerkleinerung wie durch enzymatischen Abbau geschehen; dagegen genügt ein einfaches Aufreissen der Wände nicht, um die Adsorption ausreichend zu lockern. Werden beim Abbau die kolloiden Aggregate der Wände nicht genügend tief zerlegt, so kann sich das tatsächlich freigelegte Enzym sekundär wieder an diese „Träger" binden und so eine Symplex-bildung eingehen, die einen natürlichen in der lebenden Zelle vorhandenen Symplex vortäuscht.

Wenn wir nun hier die weitere Entwicklung dieser Forschungen schildern wollen, so darf nicht vergessen werden, daß dabei ganz abgesehen von ihrer großen biologischen Bedeutung auch sehr Vieles praktisch wichtige für die Darstellung der S. als solcher sich ergeben hat. Diese Befunde werden wir § 315 wiedergeben, aber nur kurz, da ja die gesamte Methodik der S. im H. W. Bd. III, 765 von KARL SCHNEIDER bis 1928 eingehend geschildert ist, insbesondere S. 794 ff. Wir gehen also an dieser Stelle nur auf die ganz prinzipiellen Fragen des Verhaltens der S. in der Zelle und bei ihrer Freilegung durch Zerstörung der Wände ein.

WILLSTÄTTER u. RACKE **112)** hatten gezeigt, daß die Freilegung auch durch Enzyme der Hefe selbst, also durch Autolyse, vor sich gehen kann. Wenn man diese zelleignen Fermente etwa mit Essigester in der Wärme abtötet, so geht keine S. mehr aus der Zelle heraus. Das Enzym bleibt auch in der Zelle, wenn man nun einen großen Teil der Proteine mit Pepsin oder Trypsin bis zu $^3/_4$ abbaut. Erst wenn man nun die eiweißarmen

Zellreste mit Malzamylase oder „Tannase" von *Aspergillus* behandelt, wird die S. frei. Gleichzeitig geht ein großer Teil des Hefegummis in Lösung. Danach schien also die Membran eine solche aus Kohlenhydrat zu sein, in der das Hefegummi eine wesentliche Rolle spielt; es gibt tatsächlich ein das Hefegummi abbauendes Ferment in der Hefe, das nach KRAUT c.s. **121a)** auch dann noch bei der Freilegung mitwirkt, wenn man scheinbar die zelleignen Enzyme durch warmen Essigester abgetötet hat. WILLSTÄTTER u. GRASSMANN **122)** zeigten aber, daß diese Wände nicht nur aus KH bestehen. Denn es wirkt zwar weder Pepsin noch Trypsin, wohl aber Papain, durch HCN aktivirtes besser als ohne HCN. Andererseits wird die Abgabe von Hefegummi durch die Blausäure vermindert **(121a)**, da diese die zelleigenen KH-spaltenden Enzyme schädigt. Es handelt sich also bei den Wänden um Komplexe von KH + Proteinen, wie sie nicht nur mit Hefegummi, sondern auch mit Stärke und Glykogen in allen Zellen vorkommen, worauf wir im IX. H.T. zurückkommen werden. Da die Protease des Papains in dieselbe Gruppe gehört wie die der Hefe selbst, so kann man annehmen, daß auch diese eine besondere Fähigkeit hat, grade diese Eiweiß-KH-Komplexe von der Proteinseite her anzugreifen; mit anderen Worten, daß die Wirkung des Papains weit besser die proteolytischen Vorgänge bei der Autolyse der Hefezelle widerspiegelt als die wie gesagt sehr unvollkommene Wirkung von Pepsin und Trypsin. Tatsächlich konnten GRASSMANN u. PETERS **123)** das Papain durch zugesetzte Hefenproteinase völlig ersetzen, nachdem die zelleigne Proteinase der Hefe durch die Behandlung mit Essigester zerstört war.

Sie zeigten aber erneut, daß reine Malzamylase ohne Gehalt an Proteinase ebenfalls die Freilegung vollzieht; die Cellulase des Malzes wirkt dabei nicht mit. Auch die Amylase aus Taka wirkt ebenso, dagegen sind tierische Amylasen, die α-Amylasen sind, ohne jegliche Wirkung. Diese Tatsache verdient im Hinblick auf die auch sonst beobachteten Wirkungsverschiebungen zwischen α- und β-Amylasen gegenüber nativen Polyosen große Beachtung; darauf können wir natürlich erst im IX. H. T. eingehen.

Es wirken also auf den Eiweiß-KH-Komplex durchaus nicht alle Proteinasen und nicht alle Polyasen; es gibt nur einige Enzyme, die darauf eingestellt sind, nämlich die Proteinasen vom Papain-typus und die der Malz-amylase nahestehenden Amylasen des β-Typus („Saccharogen-amylasen"). Wenn aber überhaupt passende Enzyme einwirken, so scheint es gleichgiltig zu sein, ob man den Komplex von der Eiweißseite oder von der KH-Seite her abbaut; er zerfällt dann in jedem Falle genügend, um die S. völlig freizugeben.

Nach diesen Befunden ergab sich immerhin noch die Möglichkeit, daß S. doch eher ein Desmo-enzym ist als ein nur mechanisch festgehaltenes Endo-enzym; denn der Abbau der „Wände" ließ sich auch als ein Abbau einer chemischen Bindung deuten. Dagegen sprachen nur die Befunde von WILLSTÄTTER u. RACKE **112)**, daß auch eine rein mechanische Zertrümmerung der Wände zur Freilegung der S. führen kann. WILLSTÄTTER u. ROHDEWALD **124)** haben diese Versuche wiederholt unter Bedingungen, die eine Mitwirkung enzymatischer Spaltungen ausschlossen und haben erneut bestätigt, daß es möglich ist, durch rein mechanische völlige Zerstörung der Zellwände

---

121a) ***H. Kraut, F. Eichhorn, H. Rubenbauer,*** Darstellung des Hefengummis durch enzym. Abbau etc. Ber. Chem. Ges. **60,** 1644 (1927). — 122) ***R. Willstätter, W. Graßmann,*** Freileg. des Invertins aus Hefe. Bioch. Zs., **208,** 308 (1928). — 123) ***W. Graßmann, T. Peters,*** Freileg. des Inv. aus der Hefe. Zs. phys. Chem., **204,** 135 (1932). — 124) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Zustand der zuckerspalt. Enz. in der Hefe. Zs. phys. Chem., **209,** 33 (1932).

Abgeschlossen: 1. 9. 35. Ber. Phys. 86. H. 7/8.

die S. frei zu setzen. Man kann die Hefe nach völliger Abtötung der zelleignen Enzyme zerreiben und ganz kurz mit Wasser ausschütteln, oder aber frische Hefe unter flüssiger Luft mit Quarzsand zerreiben und einen Auszug mit wasserfreiem Glycerol machen. Damit ist die Natur der S. der Hefen als Endo-enzym endgiltig gesichert. Sie ist nicht chemisch verankert, sondern nur locker adsorbirt an die Zellmembran, von der sie nach völliger Zerstörung der Struktur durch ein Lösungsmittel, das etwas Elektrolyte enthält (112), abgelöst werden kann.

§ 311. **Bildung in der Zelle.** Über den Zusammenhang zwischen allgemeinen Bedingungen der Stoffwechsels und Wachstums und der Enzymproduktion der Hefen ist seit den grundlegenden Untersuchungen VON EULER's (H. W. S. 549) nicht viel gearbeitet worden.

WILLSTÄTTER, LOWRY und SCHNEIDER **118)** haben die Methode der Stimulation d. h. Anreicherung der Hefe an S. bei Gärführung mit sehr kleiner Zuckerkonz. ausgebaut. Praktische Ausführung des Verfahrens zur Darstellung hochwirksamer Präparate s. § 315. Weitere Bedingungen sind hohe Temp. (27—32°) und Zusatz von besonderen Nährstoffen (Minerale und Stickstoff). Opt. ph = 4,5—7,0. Wichtig die Auswahl der Hefe: noch für die Brauerei taugliche Hefen sind besser als mehrfach geführte, die z. T. degeneriert sind. Bei dieser Behandlung nur geringe Vermehrung der Hefe. Steigerung von Invertin-Zeitwert i. D. 330 auf 15—20, (nach VON EULER nur bis 42). Daß nicht eine allgemeine Erhöhung der Vitalität erfolgt, zeigt die Tatsache, daß nur die S. intensiv vermehrt wird; Gärvermögen, Protease und Maltase bleiben unverändert. Es scheint eine Synthese von Peptidketten einzutreten. Nach einiger Zeit tritt eine Verminderung der S. ein, die WILLSTÄTTER und LOWRY **120)** näher untersucht haben.

v. EULER c.s. **125)** haben die Synthese von Peptiden bei der Anreicherung der Hefe mit S. nicht auffinden können; auch mit dem Aufbau von Porphyrinen ist die Neubildung von S. nicht ersichtlich verbunden, wie dies bei gewissen Gäransätzen mit reichlich Zucker nachweisbar ist (H. FISCHER und FINK **126)**). Nach WEIDENHAGEN **127)** kann auch eine erhebliche Enzymneubildung auf Kosten des eigenen Zellstickstoffes vor sich gehen.

Eine praktische Verbesserung der Anreicherungsmethode von WILLSTÄTTER, LOWRY und SCHNEIDER **118)** hat WEIDENHAGEN angegeben **(127)**. Er vermeidet die mehrfache Abtrenung der Nährlösung von der Hefe. Durch Kombination von starker Lüftung und Gärung bei minimaler Zuckerkonz. erreicht er in einem Arbeitsgang binnen 8—10 h eine 10—15 fache Anreicherung der S. Auch ohne Zugabe von Stickstoffnahrung wurde 5,5 fache Anreicherung erzielt. Etwas Sauerstoff (Luft) ist nötig; Stickstoffdurchleitung erreicht nicht mehr als blosses Umrühren, reines O_2 regt die Zellvermehrung an und vermindert die Anreicherung.

b) Sonstige Fructosidasen.

1) Kryptogamen.

§ **312.** Die Saccharase der sonstigen Mikroben außer den echten Hefen ist relativ wenig erforscht. Selbst bei dem am meisten untersuchten Objekt, der Takasacch. von *Aspergillus Oryzae*, wird eine klare Erkenntnis durch das verwickelte Problem der

---

125) ***H. v. Euler, K. Josephson, H. Fink,*** Stickstoffgleichgew. in der Hefenzelle etc. Zs. phys. Chem., **154**, 310 (1926). — 126) ***H. Fischer, H. Fink,*** Koproporphyrinsynth. durch Hefe. ebd. **144**, 101 (1925). — 127) ***R. Weidenhagen,*** Anreich. von β-h-Fructosidase. Ang. Chem., **1934**, 581.

Glucosaccharase beschattet. Auch wenn wir die Sonderexistenz dieses Enzyms als erwiesen ansehen (§ 299), können wir nur aussagen, daß es in der Taka vorkommt, aber nicht, daß es ausschließlich darin enthalten ist; denn es ist auch Fructo-saccharase, gekennzeichnet durch Angriff von Raffinose, in der Taka festgestellt worden (s.u.). Jedenfalls ist also die Taka der Hauptsitz der Gluco-sacch. Man sollte also vermuten, daß auch die anderen Aspergilleen dieses Enzym enthalten, es scheint dies aber nicht oder nur selten der Fall zu sein. Allerdings fehlt meist eine völlig exakte Untersuchung einschl. der Raffinosespaltung, und andere Differenzen zwischen den einzelnen Saccharasen, wie z. B. andere ph-Kurven, sind für die Unterscheidung der beiden Enzymtypen nicht ausreichend (§ 320). Immerhin erscheint es sicher, daß die *Aspergillus*-arten vorwiegend Fructo-sacch. enthalten wie die echten Hefen, da sie Raffinose angreifen.

Dies haben in Bestätigung älterer Angaben neuerdings AMELUNG **128)** und HOFMANN **129)** gefunden, und zwar für *Asp. niger*; analoge Beobachtungen bei *Asp. Wentii* von PRINGSHEIM s.u. (l. c. 140). Vielleicht liegt eine Gluco-sacch. bei *Asp. flavus* vor (JOSEPHSON **130)**), aber die hier gefundene abweichende ph-Kurve, die zwischen der für echte Hefensacch. und der von *Penicillium* liegt, ist dafür wie gesagt nicht ausreichend. Auch bei *Penicillium* herrscht im Allgemeinen die echte Fructosacch. vor. Bei *Pen. glaucum* fand WEIDENHAGEN **131)** Spaltung von Raffinose, und DOBY **132)** eine Sacch. mit dem normalen opt. ph der Hefensacch. (4, 5). Bei einigen Stämmen scheint auch Glucosacch. vorzukommen (s. u.).

KERTÉSZ **133)** fand bei *Penic. glaucum* Produktion von Sacch. nur bei Züchtung auf Saccharose und Raffinose, sie folgt proportional der Zuckerkonz. bis zu 30 %, dann tritt Hemmung der Entwicklung auf. Gibt man erst als Nährstoff Glucose, dann Saccharose, dann wieder Glucose, so erfolgt die Bildung von S. fast nur während der Saccharose-Periode. Bei Kalihunger treten nach DOBY **132)** abnorm hohe Werte auf; analog bei Mg-Mangel, während Ca und P wenig Einfluß haben. Erhöhung der Stickstoffnahrung setzt die Produktion an S. herab (DOBY **134)**). KERTÉSZ **135)** gibt für *Penic. glaucum* Vorschriften, um den Enzymgehalt einer Kultur abzuschätzen.

Dieser setzt sich aus 2 Posten zusammen: 1) Gehalt des Mycels

$$E_1 = \frac{k \cdot g \cdot S}{\text{Ang. Trockengew.}} \times \text{Trock. Gew. des ges. Mycels}$$

2) Gehalt der Nährlösung

$$E_2 = \frac{k \cdot g \cdot S}{\text{ccm Nährlös.}} \times \text{Gesamtvolumen}$$

(k = Geschwindigkeitskonstante, S = Saccharose-Gesamtgehalt in g, Trock.Gew. = Trockengewicht des Mycels in g).

$E_1 + E_2$ = gesamter Gehalt der Kultur. KERTÉSZ gibt dann die von DOBY erhaltenen Werte in seiner Berechnung wieder (Abb. 18, S. 212).

Die Ausscheidung der S. in die Kulturflüssigkeit (H. W. S. 550) bei *Asp. niger* ist nach IWANOFF **136)** abhängig von der Permeabilität der Zelle, und diese von der Wasserstoffzahl. Bei saurer Reaktion ist sie gering und steigt gegen den Neutralpunkt. Alte im Zerfall begriffene

---

128) ***H. Amelung***, Säurebildg. aus Raffinose durch Asp. niger. Zs. phys. Chem., **187**, 171 (1930). — 129) ***E. Hofmann***, Glucoside und Disacch. spalt. Enz. aus Schimmelp. Bioch. Zs., **273**, 198 (1934). S.A. — 130) ***K. Josephson***, Rohrz. spalt. Enz. in Asp. flavus. Zs. phys. Chem., **138**, 144 (1924). — 131) ***R. Weidenhagen***, Saccharase-Spez. Zs. V.D. Zuck., **78**, 406 (1928). S.A. — 132) ***G. v. Doby, Z. J. Kertész***, Sacch. kalihungrigen Penic. Zs. phys. Chem., **189**, 177 (1930). — 133) ***Z. J. Kertész***, Reizwirk.-Vers. mit der Sacch. von Penic. Fermentforsch., **9**, 300; **10**, 36 (1928). — 134) ***G. v. Doby (E. Fehér)***, Enzyme und Salzionen. II, IV. Zs. phys. Chem., **196**, 89; **213**, 71 (1931/2). — 135) ***Z. J. Kertész***, Estim. of enz. yield in fungus cult. Jl. of Biol. Chem., **90**, 15 (1931). — 136) ***N. N. Iwanoff, M. A. Kudrjawzewa***, Aussch. der Saccharase etc. Bioch. Zs., **212**, 241 (1929).

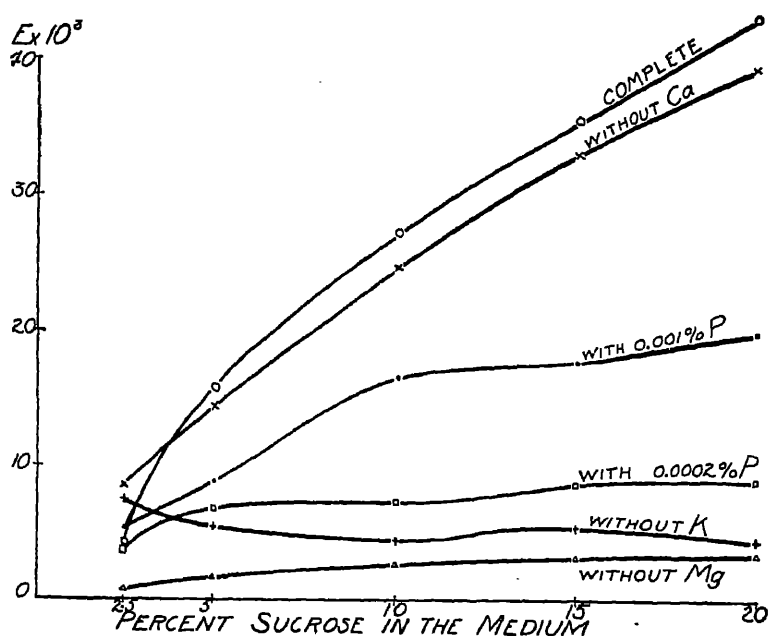



Abb. 18. E_1 von Kulturen von *Penic. glaucum* bei steigendem Zuckergehalt und verschiedenen Salzmengen nach 135).

Kulturen geben demgemäß mehr freies Enzym ab. Bei Wachstum auf Saccharose und Inulin tritt mehr S. aus als auf Glucose und Fructose, aber auch noch auf Stärke, Glykogen und Pepton erfolgt Austritt. Nach Kertész **137)** geht höchstens $^1/_3$ in die Nährflüss. über, am besten bei alkalischer Reaktion. Grenzen der Abgabe (5-tägige Kultur) ph = 4,0 bis 8,7. Nach Invertierung der Hauptmenge der Saccharose schnelle Abnahme der S., sowohl im Mycel wie in der Flüssigkeit.

Metallsalze wirken u. U. ganz verschieden auf die Entwicklung von *Asp. niger* wie auf die Bildung von S. So schwächt $MnSO_4$ die erste, verstärkt die Enzymbildung, umgekehrt Fe SO_4. $MgSO_4$ und $ZnSO_4$ in sehr kleinen Mengen vergrössern die Enzymbildung. $CdSO_4$ bei 0,5 % hemmt beide absolut (Rossi **138)**).

Über das casuistische Vorkommen von S. bei verschiedenen Mikro-organismen ist außer in den Diskussionen über Glucosaccharase und die verschiedenen Maltasen nichts Wesentliches berichtet worden, oder besser gesagt mir vor Augen gekommen. Es ist natürlich durchaus nicht unwahrscheinlich, daß mir Angaben entgangen sind, wenn sie als Nebenbefunde in Arbeiten sonst rein mykologischen oder technischen Charakters gegeben sind. Im übrigen scheint aus den dissentirenden Befunden von Weidenhagen und seinen Gegnern (§ 300) hervorzugehen, daß es sich durchaus nicht immer um Meinungsverschiedenheiten resp. experimentelle Irrgänge handelt. Es scheinen vielmehr die Hefen wie die Schimmelpilze in ihrem Fermentbestande nicht konstant zu sein, weder was das Vorkommen gesicherter Fermentarten überhaupt noch das gewisser Spielarten anlangt. Wir werden solchen schwer zu sichernden Abweichungen

137) ***Z. J. Kertész,*** Discharge of sacch. from mycelium of Penic. Plant Physiol., **6,** 249 (1931); BPh **64,** 380. — 138) ***G. Rossi c.s.,*** Infl. del solf. mang. (diversi sali) sulla prod. di invert. etc. Bioch. Ter. Sper., **19,** 55, 157 (1932).

noch oft begegnen, wir haben ja einleitend bemerkt, daß diese unsicheren Verhältnisse das Studium der Oligasen in den Mikroben sehr erschweren.

Hierher gehört z.B. der offenbar garnicht seltene Fall des Vorkommens von Glucosacch. in echten Hefen, wie dies KUHN selbst (l. c. 7) angegeben hat (§ 321). Ebenso ist gelegentlich echte Gentiobiase in Hefen beobachtet worden (KUHN, H. W. S. 586, PRINGSHEIM c.s. u.a. (§ 335)). Vor allem aber wirkt verwirrend die Anwesenheit von Fructosacch. in *Aspergillus Orzyae*, die schon KUHN selbst (l. c. 8) angab, und die dann WEIDENHAGEN **139)** durch Spaltung von Raffinose bei Fehlen einer Melibiase nachgewiesen hat, und die das Problem der Glucosacch. weiter erschwert hat, um so mehr, als diese angebliche Fructosacch. nach WEIDENHAGEN's eigenen Befunden sich erheblich von der der Hefe unterscheidet, indem sie von α-Glucose durch Affinität gehemmt wird, von Fructose nicht.

Diese Verhältnisse bei den Kryptogamen sind auch prinzipiell noch wenig geklärt, es scheinen ebensowohl halbwegs stationäre Rassenunterschiede in bezug auf die Enzymproduktion, wie auch Anpassungen an die besondere Ernährung vorzukommen, wie sie ja KERTÉSZ **135)** und HOFMANN (l. c. 129) experimentell herbeigeführt haben.

Hierzu, insbesondere zur Frage des Vorkommens von Fructo-sacch. in Schimmelpilzen noch einige Beispiele: PRINGSHEIM **140)** fand den Enzymgehalt von *Asp. Wentii* verschieden. Während eine Kultur Raffinose vollständig zerlegte, also sowohl Fructo-sacch. wie Melibiase enthielt, spaltete eine andere nur die Fructosidbindung, also Raffinose in Melibiose und Fructose: Umgekehrt zeigte sich ein holländischer Stamm von *Penicillium purpureum* im Gegensatz zu früheren Befunden gänzlich unwirksam gegen Saccharose. HOFMANN (l. c. 129) fand bei *Asp. niger* bei Züchtung auf Raffinose nur die Fructosidase, während der Pilz auf RAULINscher-Lösung gezüchtet Raffinose total zerlegte, ebenso auch seine Trockensubstanz nach Behandlung mit Alkohol-Aether.

Bakterien enthalten fast stets Sacch. Bei zermalmten Streptokokken weiterhin gefunden von STEVENS **141)**, bei Pneumokokken von AVERY **142)**; im *Termobact. mobile* von FORSSMAN **143)** (hier auch Raffinose-spaltung bei fehlender α-Glucosidase). Der opt. ph der Bakteriensacch. ist sehr hoch, wie schon ältere Befunde ergaben (AVERY und CULLEN u.a.); er liegt bei ca 7,0, bei Coli wieder von KARSTRÖM bestätigt (l. c. 43). HOFMANN (l. c. 36) fand bei einem Sulfatase-Bakterium 6,5. Colibacillen können gelegentlich ganz unwirksam auf Saccharose sein. (KARSTRÖM, TAUBER, § 300, l. c. 43, 47).

2). Phanerogamen.

§ 313. Die schon im H. W. S. 551 dargelegte Ubiquität der S. in allen Organen der höheren Pflanze, für die ja Saccharose im Gegensatz zum Tier ein echter Nährstoff und somit Substrat des Stoffwechsels ist, macht einzelne casuistische Beobachtungen nicht sehr interessant; es ist auch nur wenig zu berichten.

---

139) ***R. Weidenhagen c.s.,*** Taka-Saccharase. Zs. V. D. Zuck., **78,** 125, 242, 406 (1928). S.A. — 140) ***H. Pringsheim, H. Borchardt, F. Loew,*** Spez. der Sacch. Zs. phys. Chem., **202,** 3 (1931). S.A. — 141) ***F. A. Stevens, R. West,*** Peptase etc. of . . . streptoc. Jl. of Exp. Med., **35,** 23 (1923). — 142) ***O. T. Avery, Gl. E. Cullen,*** Enz. of pneumoc. Jl. of Exp. Med., **32,** 547, 571, 582; **39,** 199 (1922/4). — 143) ***S. Forssman,*** Enzymsystem des Termobakt. Bioch. Zs., **264,** 31 (1933).

S. in *Impatiens noli tangere* ZELLNER **144**); in Blättern und Blüten von *Convallaria majalis*, Trennung von anderen Enzymen durch specifische Elution KRITSCHEWSKAJA (§ 307, l. c. 74a).

Nach (**145**) sind die ph-Optima der S. verschiedener Blätter verschieden; sie liegen zwischen 5,6 und 6,6; auch hier liegt vielleicht Glucosacch. vor; nur bei *Platanus orientalis* ph = 4,5.

Auch die S. von *Solanum indicum* hat einen opt. ph von 6,0 (TAUBER **146**)). Bei Zuckerrüben findet sich S. in den Blättern, nicht Wurzeln. Bei Kalihunger abnorm hohe Werte (DOBY **147**)); bei Blättern von Zuckerrohr (*Saccharum*) dagegen bei K-Mangel weniger (**147a**) v. DOBY c. s. haben die Saccharase von Roggensprossen bei verschiedener Ernährung untersucht. Die Menge an S. ist bis auf das dreifache gesteigert bei Mangel an K, nicht bei Mangel an P. (**147b**)). Entscheidend ist der N-Gehalt des Bodens (**147c**)), dem der Gehalt an S. proportional ist; am deutlichsten drückt sich dies aus, wenn man die Aufzucht bei ph = 6 vornimmt, bei dem die höchste Konz. an S. erreicht wird. Die Art des N ist gleichgiltig, es kann ebensogut NO_3 wie Harnstoff sein. In der Nacht und mit dem Alter nimmt der Gehalt an S. ab. Der opt. ph lag stets bei 4,5—4,6.

Auf eine vom Darm her aus der Pflanzennahrung resorbirte pflanzliche S. führt WEIDENHAGEN **148**) eine Beobachtung von Fructosidase im Pferdeblut zurück. Ebenso kann man ohne specielle Untersuchung nicht aussagen, woher die S. der Haustierfaeces (Ziege, Schwein) stammt (KRZYWANEK **149**)), ob aus dem Darm selbst oder aus der Nahrung.

3). Wirbellose Tiere.

§ 314. Die Frage nach der Natur der S. bei den Wirbellosen ist noch nicht geklärt. Die der S. der Wirbeltiere zwar auch noch nicht, aber diese, die ja nur singulär im Darm und in den Leukocyten vorkommt, haben wir vorläufig bis zur endgiltigen Entscheidung zu den Gluco-saccharasen gestellt (§ 322) auf grund allgemeiner Erwägungen betr. ph etc. (§ § 299, 300). Die S. der Wirbellosen scheint vorläufig eher zu den Fructosidasen zu stellen zu sein, wenngleich auch hier wie bei den Schimmelpilzen ganz grundsätzliche Schwierigkeiten der Deutung vorliegen, die auf eine Mischung verschiedener Enzymtypen oder auf eine primitivere Form mit verwaschenen Spezifitätsgrenzen weisen. Wie bei den Schimmelpilzen versagt auch die Tatsache der Spaltung von Raffinose zur endgiltigen Diagnose; sie wird zwar häufig angegeben, wie schon im H.W. S. 553 berichtet; in anderen wichtigen Fällen wird aber grade das Gegenteil angegeben, so bei den Bienen (und im Honig) die Nichtspaltung von Raffinose, wohl aber die von Melecitose, was zur Diagnose Gluco-sacch. führen könnte. Andererseits findet man häufig bei Wirbellosen den zweifellosen opt. ph der echten Fructosidase; die Verhältnisse sind noch nicht zu durchschauen, wir wollen also vorläufig die Angaben über S. der Wirbellosen hier unterbringen.

S. findet sich hauptsächlich bei höheren Wirbellosen (Mollusken, Dekapoden, Insekten); jedoch kommt sie auch bei ganz primitiven Tieren vor, so bei der Qualle *Velella spirans* (HAU-

---

144) ***J. Zellner***, Chem. Best. heim. Arzneipflanzen, Arch. der Pharmac., **265**, 27 (1927). — 145) ***A. V. Blagoveschenski, N. Sossjedow***, Spez. cond. of ... leaf invert. Biochem. Jl., **19**, 350 (1925). — 146) ***H. Tauber, J. S. Kleiner***, Some enz. of Solanum ind. Jl. of Biol. Chem., **105**, 679 (1934). — 147) ***G. Doby, R. P. Hibbard***, Sacch. kalihungr. Zuckerrüben. Bioch. Zs., **178**, 139 (1926). — 147a) ***C. E. Hartt*** (Fermente des Zuckerrohrs). Bot. Gaz., **88**, 229 (1929); cit. n. 147b. — 147b) ***G. v. Doby, A. Bodnár***, Invertasekonz. von Roggensprossen bei Kali- bezw. Phosphatmangel. Fermentforsch. **14**, 250 (1934). — 147c) ***G. v. Doby, J. Makfalvi***, Invert. Konz. von Roggensprossen bei N-Mangel. ebd. **14**, 256 (1934). — 148) ***R. Weidenhagen***, Vork. von β-h-Fructos. in Plasma etc. Zs. V. D. Zuck., **82**, 318 (1932). — 149) ***Fr. W. Krzywanek, Bedi-i-Schakir***, Ferm. Geh. der Haustierfäces. Bioch. Zs., **220**, 342 (1930).

ROWITZ **150**)). Bei Crustaceen ist schon früher echte S. gefunden worden (H. W. S. 553). Neuerdings fand eine S. mit dem opt. ph der Hefensaccharase (4, 5) im Magensaft des Flußkrebses *Potamobius astacus* KRÜGER **151**), **152**), ebenso WIERSMA **152a**); KRÜGER **153**) auch im Verdauungssaft von *Octopus* und *Aplysia*. Dagegen hat die S. des Darmsaftes von *Bombyx mori* nach SHINODA **154**) einen opt. ph von 7,0, die der Darmwand soll nach YAMAFUJI **155**) sogar ein Optimum von 9,5 haben, allerdings nur als Gipfel einer sehr flachen Kurve von 5,5—10,0. Dieser ph entspricht dem des Blutes und der Verdauungssäfte der Seidenraupe. Dieser Befund spricht nun allerdings stark für eine Glucosacch., wenn man hier nicht ohne weiteres dazu schreiten will, die Spaltung von Saccharose im Sinne WEIDENHAGEN's der Maltase zuzuschreiben.

Am häufigsten ist die Honigbiene, *Apis mellifica*, auf S. untersucht worden, weil ja bei diesen Tieren die Inversion der Saccharose eine spezielle Leistung für die Bereitung des Honigs darstellt. Ältere Beobachtungen über das Vorkommen von S. im Darmtrakt der Biene sind u.a. von EVENIUS **156**) bestätigt worden. Es ist auch hier wieder nicht sicher, welcher Art diese Saccharase ist. Es scheint sich aber mit denselben Vorbehalten wie stets eher um Glucosaccharase zu handeln. PHILLIPS **157**) und BERTHOLF **158**) fanden keine Spaltung von Raffinose im Bienendarm von Bienen selbst und deren Larven; dasselbe fand PAPADAKIS **159**) für das Enzym des Honigs selbst. Hingegen geben PHILLIPS und BERTHOLF an, daß Bienen und Larven Melecitose als Nahrungsmittel ausnutzen können, so daß sie ein darauf eingestelltes Ferment in ihrem Darm annehmen, also eben Glucosaccharase. Da aber nach PHILLIPS **160**) auch Maltase im Bienendarm anwesend ist, so stehen wir wieder vor der offenen Frage, ob in diesem Falle WEIDENHAGEN Recht hat, und es sich um Angriff der Saccharose einfach durch Maltase handelt.

Bei Bienen findet sich S. außer im Mitteldarm auch in der Schlunddrüse, nicht in der Brustdrüse (KOSMIN **161**)). Während aber der Darm sofort nach dem Schlüpfen S. enthält, bildet sich das Enzym in der Schlunddrüse erst langsam aus und erreicht bei etwa 30-tägigen Tieren sein Maximum.

Die S. des **Bienenhonigs** ist häufig untersucht worden, schon aus rein nahrungsmittelchemischem Interesse (Unterscheidung von Kunsthonig etc.) (eingehende Literatur bei PHILIPPS **157**)).

Hier ist noch weniger klar, was für eine S. vorliegt. In seinen eingehenden Studien über die Einheitlichkeit der S. hat sich NELSON **162**) (l. c. 222—225) auch mehrfach mit der des Honigs beschäftigt und allerlei Unterschiede gegenüber der S. der Hefe gefunden. Vor allem soll sie

---

150) ***F. Haurowitz, H. Waelsch,*** Zus. der Qualle Velella. Zs. Phys. Chem., **161**, 300 (1926). — 151). ***P. Krüger, E. Graetz,*** Ferm. des Flußkrebs-Magensaftes. Zool. Jb., **45**, 463 (1929). S.A. — 152) ***P. Krüger,*** Fermentstoffwechsel der nied. Tiere. Erg. Phys., **35**, 538 (1933). S.A. — 152a) ***C. A. G. Wiersma, R. van der Veen,*** Kohleh. Verd. bei Astacus. Zs. vergl. Phys., **7**, 269 (1928). S.A. — 153) ***P. Krüger,*** Verd. F. der Wirbellosen. Sitzb. Akad. Berlin, **26** (1929). S.A. — 154) ***O. Shinoda,*** Dig. enz. of the silkworm. Jl. of Biochem., **11**, 345 (1930). — 155) ***K. Yamafuji,*** Verdau. Enz. der Seidenraupe. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **8**, 156 (1932). S.A. — 156) ***J. Evenius,*** Ferm. im Darmkanal der Honigbiene. Arch. Bienenk., **8**, 229 (1926); BPh. **40**, 363. — 157) ***E. J. Phillips,*** Utiliz. of carboh. by honeybees. Jl. of Agr. Res., **35**, 385 (1927). — 158) ***L. M. Bertholf,*** Utiliz. of carboh. by honeybee larvae. ebd. **35**, 429. — 159) ***Ph. E. Papadakis,*** Invert. from honey. Jl. of Biol. Chem., **83**, 561 (1927). — 160) ***E. J. Phillips,*** Verw. der Melecitose durch die Honigbienen. Zs. Unt. Lebensm., **64**, 383 (1932). — 161) ***N. P. Kosmin, P. M. Komarow,*** Invert. Vermögen der Speicheldrüsen etc. Zs. vergl. Physiol., **17**, 267 (1932); BPh **69**, 479. — 162) ***J. M. Nelson, D. J. Cohn (C. Th. Sottery),*** Invert. in honey. Jl. of Biol. Chem., **61**, 193; **62**, 139 (1924).

Raffinose nicht angreifen, wie sein Schüler PAPADAKIS 159) mitteilt (Prufung von Melecitose habe ich nicht auffinden können). Ferner zeigen sich eigenartige Unterschiede in der Kinetik, besonders der Anfangsgeschwindigkeit; der opt. ph schwankt von 5,5—6,3, während er bei Hefenenzym unter allen Umständen konstant bei ca. 4,5 liegt. Ein ganz merkwürdiger Unterschied ist die Aktivirung durch kleine Mengen β-Glucose, während größere Konzz. hemmen, Fructose hemmt wesentlich schwächer (§§ 308, 320). α-Methylglucosid hat keinen großen Einfluß. Hier scheint also auch wie bei der Biene eher Glucosaccharose vorzuliegen.

3) Darstellung und Eigenschaften.

§ 315. Von einer **Darstellung der Saccharase** in dem Sinne, wie wir es heute von einem Enzympräparat verlangen, dh. von möglichst hochaktiven, also von unwesentlichen Begleitstoffen und von anderen Enzymen weitgehend befreiten Enzympräparaten und mit einer etwa dem wirklichen Gehalt des Rohstoffes entsprechenden Ausbeute, kann man auch heute noch nur bei der S. der Hefen sprechen; bei anderen S. ist man über das Stadium einfacher wirksamer Extrakte, meist nur in qualitativer Ausbeute, kaum jemals hinausgekommen; s. z.B. die Versuche adsorptiver Trennung von pflanzlicher Invertase von anderen Enzymen (§ 307, l. c. 74a). Wir können uns also hier auf die S. der Hefen beschränken. Die gewaltigen Fortschritte, welche die präparative Methodik der Erkenntnis des Zustandes der S. in der Zelle verdankt, und die daraus erwachsenen präparativen Verfahren im Einzelnen, wie sie sich in den Händen WILLSTÄTTER's und seiner Schüler sowie VON EULER's c.s. entwickelt haben, konnten wir bereits im H. W. S. 554 mitteilen; seitdem sind diese Erkenntnisse vertieft und somit die Methodik an sich bereichert worden, vorüber bis 1928 bereits K. SCHNEIDER im H. W., Bd. III berichtet hat. An dem Hauptprinzip, der Aufschließung der das Enzym abschließenden Wände, sei es durch die eigenen Fermente der Zelle selbst (Autolyse), sei es durch zugesetzte Fermente, wie z.B. Papain oder Malzamylase, ist nichts geändert worden, ebensowenig an den grundsätzlichen Verfahren der Reinigung des in Lösung gebrachten Ferments durch auswählende Adsorption, Fällungen, Elektrodialyse etc. Das durch Kombination der verschiedenen Methoden erhaltene, im H. W. S. 557 noch erwähnte damals wirksamste Präparat zeigte an Einheiten: **Zeitwert (ZW) = 0,163; Saccharasewert (SW) 6,14; If 374.** (WILLSTÄTTER u. SCHNEIDER l. c. 116). Weitere Verbesserungen der Methodik haben zu größeren und schnelleren Ausbeuten geführt, nicht mehr zu einer wesentlichen Steigerung der Wirksamkeit; s. WILLSTÄTTER c.s. (l. c. 117—121), und VON EULER u. JOSEPHSON **162)**. Die wirksamsten Präparate mit Tannin-fällung führten bis zu **SW von 7,3**, mit Bleiphosphatfällung maximal zu **SW 11,9**. ALBERS (l. c. 172a) kam bis zu **14,7**.

Das auf „Stimulation", d.h. Anreicherung der Hefe an S., und dann Freilegung durch Autolyse aufgebaute Verfahren der praktischen Darstellung nach WILLSTÄTTER c.s. **118)**, **121)** gebe ich hier in der Form wieder, wie es WEIDENHAGEN (l. c. 2, S. 449) kurz und präcis geschildert hat. (Weitere Einzelheiten bei SCHNEIDER im H. W. Bd. III).

Stimulation 118): 200 g abgepreßte Hefe werden in vier Liter Nährsalzlösung eingetragen, die in einem Filtrierstutzen auf 28° vorgewärmt ist. Sie enthält je 8 g prim. Kaliumphosphat und prim. Ammoniumphosphat, sowie je 2 g Kaliumnitrat und wasserhaltiges Magnesiumnitrat. Die Flüssigkeit wird mit mechanischer Rührung in starker Bewegung gehalten. Temperatur 27°. Aus einer tubulierten Flasche tropft 20 %ige Rohrzuckerlösung so ein, daß 100 ccm in 1

---

163) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Saccharase IV, V, VI. Ber. Chem. Ges., **57**, 859 (1924); Zs. Phys. Chem., **145**, 130 (1925); Ber. Chem. Ges., **59**, 1129 (1926).

Stunde zufließen. Nach je 2—3 Stunden trennt man zweckmäßig die Hefe von der alkoholhaltigen Flüssigkeit und erneuert die Nährlösung. Zuerst kann man dekantieren, später muß die Abtrennung mit der Zentrifuge ausgeführt werden. Zweckmäßig wird die Gärführung so vorgenommen, daß in 5—8 Stunden 50—80 % Zucker eintropfen, sodann durch eine engere Kapillare 10—20 % über Nacht. Auf diese Weise läßt sich eine Enzymanreicherung bei ungünstigen Anfangswerten auf das 13—15fache, bei Hefen von besonders günstigen Anfangswerten auf das 8 bis 10fache erzielen.

Die so stimulierte Hefe wird nunmehr zur Freilegung des Enzyms der **fraktionierten Autolyse 121)** unterworfen. Abtötung der Hefe in unverdünntem Zustand mit 10 % Toluol bei 30°, Verdünnen mit gleichem Gewicht Wasser nach einer Stunde und Neutralisieren mit verdünntem Ammoniak. Abtrennung der neutral gehaltenen Vorfraktion nach zwei weiteren Stunden, Freilegung des Invertins in 1 Tag bei 30° mit einer Ausbeute von 95 % des nach der Abtrennung noch vorhandenen oder etwa 85 % des gesamten Hefeinvertins. Das mit der doppelten oder 4fachen Wassermenge verdünnte Autolysat wird zunächst mit der Zentrifuge abgetrennt und zweckmäßig erst danach durch geringes Ansäuern mit Essigsäure von Eiweiß vollständig befreit. Die weitere Reinigung erfolgt beispielsweise durch fraktionierte Fällung mit Tannin bei tiefer Temperatur und führt zu Präparaten bis zum Saccharasewert 7,3. Fraktionierte Adsorption an Bleiphosphat lieferte sogar Saccharasewerte von 9,6 und 11,9.

Albers (l. c. 172a) erzielte maximale Anreicherung schon in 2—4 h. (bis auf das Zehnfache). Es hängt dies mit dem Alter der Hefen zusammen. Solche, die mehr als 5 mal zur Gärführung benutzt waren, sind überhaupt unbrauchbar. Dort auch weitere Einzelheiten zur Reinigung der S. Die jeweilig beste Methode ist für die verschiedenen Hefen verschieden. Neu ist eine direkte fraktionierte Adsorption aus dem rohen Autolysat mit Tonerde $C\gamma$. Fraktionierte Elution führte zum wirksamsten bisher überhaupt dargestellten Präparat (S. W. = 14,7, s. o.).

Eine Darstellung völlig eiweißfreier Präparate aus Hefe durch saure Autolyse bei ph = 5 haben Lutz u. Nelson **164)** angegeben; Näh. s. u. Ein besonderes mehr praktischen Zwecken dienendes Verfahren, das sich zur Verarbeitung großer Hefemengen (bis 25 Kilo) eignet, wurde von Weidenhagen **165)** beschrieben. Es benutzt die Eigenschaft des Enzyms in den Autolysaten, in denen eine Vorfraktion abgetrennt wurde, mit Tannin einen unlöslichen Niederschlag zu bilden, der sogar ohne Aktivitätsverlust mit Wasser gewaschen werden kann. Aus dem Niederschlag, in dem sich das Enzym anscheinend in adsorptiver Bindung befindet, läßt sich die S. zweckmäßig mit sek. Phosphat wieder in Lösung bringen, aus der sie nach Ansäuern mit Aceton gefällt werden kann. Man erhält pulverförmige Substanzen bis zur 1600fachen Reinheit gegenüber der Ausgangshefe, was Saccharasewerten bis zu 2 entspricht.

Früher war es eine besondere Schwierigkeit, daß den Saccharasepräparaten hartnäckig das Hefegummi beigemengt war. Seine Ablösung ist bereits Willstätter gelungen (H. W. S. 554). Wie bereits § 310 erwähnt, entsteht das Hefegummi mit beim Abbau der einhüllenden Wände durch den enzymatischen Abbau auch bei der Autolyse. Auf diesem Wege haben es Kraut c.s. **166)** dargestellt und durch auswählende Adsorption gereinigt. Dabei wirkt ein spezifisches Enzym der Hefen mit, das sonst nirgend vorzukommen scheint; über dies Enzym als solches ist Näheres noch nicht bekannt.

Abnorme Saccharasen kommen gelegentlich von selbst vor; Nelson **167)** konnte sie darstellen durch Behandlung fertiger Präparate mit kolloidem Eisenhydroxyd. Unter Wirkungssteigerung ergab sich ein bei 25° und ph = 4,5 instabiles Präparat, das durch Zusatz von

---

164) ***G. J. Lutz, J. M. Nelson,*** Prep. of highly act. yeast invert. Jl. of Biol. Chem., **107**, 169 (1923/4). — 165) ***R. Weidenhagen,*** β-h-Fructosidase, Zs. V. D. Zuck., **81**, 501 (1931). — 166) ***H. Kraut, F. Eichhorn (H. Rubenbauer),*** Ue. Hefegummi etc. Ber. Chem. Ges., **60**, 1639, 1644 (1927). — 167) ***J. M. Nelson, F. Hollander (R. W. Kerr),*** Uniform. in invert. act. Jl. of Biol. Chem. **58**, 291; **59**, 495 (1924).

Protein wieder stabilisiert werden konnte. Auch gekochtes Invertin wirkt stabilisirend, aber nicht gekochtes abnormes Invertin. Auch Verdünnung allein führt zu abnormen Präparaten. Der Grund ist wohl Entziehung schützender Begleitstoffe, resp. des zugehörigen Pheron im Sinne KRAUT's (§ 263).

Trennung von Saccharase und Maltase. In den hochgereinigten Präparaten sind zwar die anderen Hefenenzyme praktisch völlig beseitigt, aber eine Trennung von der Maltase als dem hartnäckigsten Begleiter war durch die bisher wiedergegebenen Methoden nicht zu erzielen. Hierzu brauchte man Adsorptionsmittel von noch verfeinerter auswählender Kraft. Auf diesem Wege ist die Trennung von S. und Maltase WILLSTÄTTER u. BAMANN **168**) gelungen. Es zeigte sich, daß gealtertes Tonerde-gel $Al(OH)_3$ und noch besser ein Gel der Formel AlO_2H eine ausgesprochene Vorliebe für die Maltase hat, dagegen S. nur sehr wenig adsorbirt. In diesen Adsorbaten verhalten sich dann die beiden Enzyme wieder verschieden gegen Eluentia, so daß sie so völlig getrennt werden können. Z.B. eluirt primäres Alkali-phosphat nur S. und diese vollständig, während man dann etwa mit schwach alkalischem Phosphat die Maltase eluiren kann. Zur Gewinnung reiner S. verwendet man möglichst saccharasereiche Ausgangspräparate. Genaue Beschreibung des Verfahrens bei BAMANN, H. W. Bd. III, S. 862. Verbesserung der Methode durch WEIDENHAGEN s. § 325.

§ 316. Chemische Natur der Saccharase. In den hergestellten hochwirksamen Präparaten befindet sich nun also das Ferment selbst. Dies besteht wieder aus der eigentlichen Wirkgruppe, dem **Agon**, und dem unmittelbar noch zum System „Enzym" gehörigen Träger, dem **Pheron**, das wir auch als spezifisch in seiner chemischen Natur anzunehmen haben (vgl. „Einführung"). Außerdem aber enthalten zweifellos auch die reinsten Präparate noch weitere Stoffe, die man nun als die „Begleitstoffe" zusammenfaßt. Diese sind wechselnd an Art und Menge, und wie bei allen Fermenten können wir auch hier noch kein sicheres und ins Einzelne gehendes Urteil über ihre Bedeutung abgeben. Nur ganz grundsätzlich kann man unterscheiden völlig nebensächliche Stoffe, die eben nur noch nicht abgetrennt werden konnten, von solchen, die noch im Weiteren zum System gehören, wie z.B. überschüssiges Pheron, das für die Stabilität wichtig ist und wahrscheinlich bis zu einem gewissen Grade auch darin durch noch Pheron-ähnliche Stoffe, etwa Proteine oder hohe Polypeptide, ersetzt werden kann (vgl. die „Einführung" und § 263).

Weiterhin können diese nicht mehr zum Pheron selbst gehörigen Begleitstoffe, die WILLSTÄTTER **169)** in anderem Zusammenhang als **„Schlepper des Enzyms"** bezeichnet, noch bedeutungsvoll sein für die Wirkung äußerer Faktoren, insbesondere von Giften; dies gilt bei der S. weniger als bei anderen Enzymen, weil man hier, wie wir gleich sehen werden, einige charakteristische Giftwirkungen mit großer Wahrscheinlichkeit als direkt auf das Agon gerichtet annehmen kann.

Diese grundsätzlichen Erwägungen werden immer wieder nötig, wenn wir nun bezgl. der Frage nach der chemischen Natur der Enzyme die einzelnen Befunde und Annahmen genauer prüfen wollen, und besonders die beinahe bei allen Enzymen immer wieder diskutirte Frage, ob das betr. Enzym, hier also die S., „ein Protein ist". Hier muß man schon die reine Problemstellung schärfer fassen, denn diese Aussage

---

168) ***R. Willstätter, E. Bamann,*** Trenn. von Malt. und Sacch. Zs. phys. Chem., **151**, 273 (1926). S.A. — 169) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Enzyme der Leucocyten VI. Zs. phys. Chem. **203**, 189 (208), (1931). S.A.

kann schon an sich zwei zwar ähnliche, aber doch nicht identische Sachverhalte einschließen. Es kann nämlich entweder das ganze System Ferment ein Protein wirklich sein; das würde besagen, daß beides zusammen, Agon + Pheron, ein bestimmtes Protein (oder, um das ein für alle Mal zu sagen, ein hohes Polypeptid) ist, das die eigentliche charakteristische Wirkgruppe innerhalb der Polypeptid-ketten eingelagert enthält; oder aber es ist nur der Träger, das Pheron, ein Protein, und das Agon ist nicht zum Molekül gehörig eingelagert, sondern auf der Oberfläche angelagert, adsorbirt. Diese Frage wird z. Z. bei einigen Fermenten (Urease, Pepsin, Tryptase) lebhaft diskutirt, bei der Saccharase ist sie bisher nicht bewußt gestellt worden; nach dem vorliegenden Material kann man aber mit einiger Sicherheit sagen, daß hier wohl nur das Pheron ein proteinähnlicher Stoff ist (s.u.).

Man muß sich aber ferner darüber klar werden, mit welcher Methodik man an dieses Kernproblem der Enzymchemie herangehen kann. Man hat seit der Frühzeit der Fermentchemie geglaubt, mit rein analytischer Methodik an diese Frage heranzukommen, und noch neuerdings hat insbesondere VON EULER c.s. auf grund verfeinerter Methoden an Reinpräparaten diese Frage lösen zu können geglaubt. Indessen scheint dies nicht möglich zu sein. Die rein analytische Untersuchung der Enzympräparate kann über die chemische Natur des Ferments keine Auskunft geben, wenn wir mit WILLSTÄTTER annehmen, daß auch noch bei sog. Reinpräparaten Alles das, was man analysiren kann, in der Hauptsache „Schlepper" sind, daß mit anderen Worten für diese rein analytische Methodik nicht nur die Wirkgruppe, sondern auch noch der eigentliche Träger in der Masse der Begleitstoffe verschwindet. Jedenfalls entzieht sich die Wirkgruppe bisher jedem Versuch des direkten analytischen Nachweises.

Damit erklären sich ohne weiteres die analytischen Differenzen, die man zwischen Präparaten gleicher Wirksamkeit aufgefunden hat, und die zu der Diskussion zwischen VON EULER c.s. **170), 171)** und WILLSTÄTTER geführt haben. EULER erklärte seine Zahlen dadurch, daß das System Enzym an sich ein Protein sei, die Zahlen von WILLSTÄTTER passten darauf einmal besser, einmal schlechter. Infolgedessen nahm WILLSTÄTTER eine Zeit lang an, daß die Wirkgruppe mit ganz verschiedenen, auch analytisch verschiedenen Trägern einen wirksamen Symplex bilden könne; erst später gelangte er zu der Überzeugung, daß man analytisch das System überhaupt nicht erfassen kann, daß es eingebettet ist in andere an sich für die Wirkung gleichgiltige kolloide Massen verschiedener analytischer Zusammensetzung. Dadurch ist eine weitgehende Klärung der scheinbaren Widersprüche herbeigeführt worden, denn nunmehr ist es durchaus möglich, ja sogar wahrscheinlich, daß das eigentliche System Enzym, d. h. eben Agon + Pheron, wirklich ein Protein ist in dem Sinne, daß das Pheron ein Protein ist, auf dem das Agon ausgebreitet ist; aber ein Beweis durch chemische Analyse läßt sich eben dafür nicht führen. Die Beweisführung ist vielmehr eine indirekte: die Saccharase ist ein N-haltiger Ampholyt mit einer basischen und einer sauren Gruppe, wahrscheinlich eben aus Aminosäuren aufgebaut, worüber nun Näheres zu berichten ist. Jedenfalls besteht nunmehr ein nennenswerter Unterschied zwischen den Auffassungen VON EULER's und WILLSTÄTTER's nicht mehr.

In seiner etwas anderen Ausdrucksweise vertritt auch FODOR **172)** die Ansicht, daß das

---

170) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Saccharase IV, VI. Ber. Chem. Ges., **57**, 859; **59**, 1129 (1924/6). — Saccharase V. Zs. phys. Chem., **145**, 130 (1925). — 171) ***K. Josephson,*** Physik. Ch. der Fermente. Hb. der Bioch. Ergänz. Werk, Bd. I, 669. Jena 1933. — 172) ***A. Fodor, Ch. Epstein,*** Regenerat. von Sacch. etc. Zs. phys. Chem., **167**, 1 (1927).

eigentliche Enzym, die „zymohaptische Gruppe" nicht immer an denselben Träger gebunden sein muß, wobei freilich zu beachten ist, daß FODOR unter „Träger" etwa das versteht, was WILLSTÄTTER unter Träger + Schleppersubstanzen versteht. FODOR nimmt an, daß je nach der Bereitung der wirksamen Präparate eine beständige Form der Bindung besteht mehr an den genuinen Träger, wie er in Hefe-maceraten vorliegt, oder an sekundäre Träger, wie sie in Autolysaten vorhanden sind. Die Systeme mit dem genuinen Träger sind stabiler, aber z. T. weniger wirksam. Er nimmt Übergänge aus der stabilen in die instabile Form an wegen gewisser Regenerations-erscheinungen bei Hefe-maceraten, die bei Autolysaten niemals auftreten.

Die rein analytischen Zahlen für C und N besagen also an sich garnichts, immerhin ist es für die Gesamtfrage nicht unerheblich, daß das Gesamt-N bei den reinsten Präparaten WILLSTÄTTER's meist unter 10 % blieb. Ein sozusagen „reines Protein" kann also das Präparat Invertin in dieser hochgereinigten Form nicht sein.

Eine Zeitlang schien, es, als ob ein Gehalt an Tryptophan essentiell für das Enzym als solches sei, denn VON EULER u. JOSEPHSON (l. c. 170, IV) fanden es regelmäßig und ziemlich konstant (ca. 5,5 %). Aber auch Tryptophan ist kein unbedingt notwendiger Bestandteil des Systems Saccharase (vgl. a. l. c. 186). Nach WILLSTÄTTER (l. c. 119, 121) gibt es zwar keine präparative Methode, um stets reproduzirbar mit Absicht tryptophanfreie S. zu erhalten; aber unter den verschiedenen Anteilen finden sich immer wieder solche, die bei hoher Aktivität frei sind von Tryptophan; auch wenn die feinere spektroskopische Messung noch Tryptophan zeigt, so steht seine Menge in keinem Verhältnis zur Wirksamkeit sehr hochwertiger Präparate (ALBERS **172a**)). Dieser Eiweißbaustein hat also sicher keine unbedingte Bedeutung für das System Enzym, und nicht einmal für die Stabilität, also das weitere System. Es kann auch keine Entscheidung für die Proteinnatur bringen, wenn EULER u. JOSEPHSON (l. c. 170, VI) darauf hinweisen, daß die N-Verteilung in den Präparaten von S. gegenüber Proteinen keine Besonderheiten darbietet, daß stabile Ringe nicht aufzufinden sind, und daß der S-Gehalt hoch ist. Eher gegen eine Protein-natur des engeren Systems spricht der eigene Befund **(173)**, daß Pepsin S. garnicht angreift, Tryptase schwer; dann allerdings vermindert sich die Aktivität symbat mit der Spaltung, danach könnte man also eher auf hohe Peptone als auf eigentliche Proteine schließen.

Im ganzen wird man es also für wahrscheinlich halten können, daß das ganze System Enzym einen proteinartigen oder peptonartigen Anteil hat, wohl eben als Pheron; aber der zu niedere N-Gehalt spricht dafür, daß zum weiteren System dann auch noch N-freie Substanzen gehören.

Wie das Enzym in der Zelle selbst an Komplexe von Protein + KH gebunden ist, so ist es wohl der Regel nach auch in den dargestellten Präparaten noch an solche gemischten Komplexe als Träger gebunden. Die Zusammensetzung dieser Komplexe ist nicht absolut stabil und sozusagen zwangsläufig für die Wirksamkeit, sondern läßt sich durch die Art der Darstellung ebenso verschieben, wie es für die Freilegung aus den Komplexen der Zelle selbst durch Anwendung verschiedener aufschließender Fermente, Proteasen oder Amylasen möglich ist. Wie Versuche von LUTZ u. NELSON (l. c. 164) zeigen, kann man gleich hochwirksame Präparate von S. darstellen, die je nachdem mehr an KH oder mehr an proteinartige Träger gebunden sind.

Verwendet man nämlich saure Autolyse (ph = 5), so erhält man Präparate, die zwar Reaktionen auf Protein-abbaustoffe geben, aber nicht auf eigentliches Protein. Sie sind fast vollständig löslich in gesättigten Lösungen von Ammonsulfat; an Farbenreaktionen zeigen sie z.B.

172a) ***H. Albers, I. Meyer,*** Absorptions-spektrogr. Unt. von Saccharasepräp. ebd. **228,** 122 (1934). S.A. — 173) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Vers. zur enzym. Spalt. der Sacch. Zs. phys. Chem., **138,** 11, 38 (1924).

MOLISCH und Tryptophanreaktion. Verwendet man aber neutrale Autolyse (ph = 7), so erhält man bei gleicher Wirksamkeit Eiweiß-präparate, die keine Reaktion auf KH zeigen.

Aus allen diesen Einzelbeobachtungen zieht WILLSTÄTTER **174)** den allgemeinen Schluß darauf, wie die darstellbaren hochwirksamen Enzym-systeme beschaffen sind. Man kann natürlich bei der Reinigung nicht alle das System bildende Trägersubstanzen entfernen, denn dann zerstört man eben das System. Man kann aber durch verschiedenartige Methodik, durch eine besondere Art der Auswahl bei der Adsorption etc. eine ganze Gruppe entfernen, ohne daß allein dadurch Wirkung und Stabilität leiden; also je nachdem Proteine, Kohlenhydrate, Phosphor-verbindungen. Alle diese Stoffgruppen sind einzeln betrachtet und an sich für das System entbehrlich. Allgemein gilt nur, daß irgend eine dieser hochmolekularen Gruppen anwesend sein muß, als Träger an sich oder als stabilisirender Schlepper, wahrscheinlich also nach KRAUT überschüssiges Pheron selbst. Es folgt also wieder, daß die chemische Analyse für das eigentliche engste System garnichts aussagen kann: wir kennen von der Saccharase bisher weder das Agon noch den eigentlichen Träger, das Pheron, seiner chemischen Natur nach.

Was wir überhaupt von der Gesamtstruktur des ganzen Systems Enzym wissen, verdanken wir allgemeinen Erwägungen, die sich z. T. aus den Aktivitätsbedingungen, z.T. aus der hemmenden Einwirkung spezifischer Gifte erschließen lassen. So kann man z. B. mit Sicherheit sagen, daß der eigentliche Träger ein Ampholyt sein muß; und daraus folgt wieder mit großer Wahrscheinlichkeit, daß er ein hohes Polypeptid oder ein Protein selbst sein wird. Denn es ist nach Allem was wir wissen schwer einzusehen, was sonst für eine hochmolekulare Stoffgruppe die Rolle des Ampholyten spielen sollte.

VON EULER u. JOSEPHSON **(170)**, IV, VI) schließen aus ihren ph-Aktiv.-Kurven, daß sich zweierlei Gruppen nachweisen lassen: auf der alkalischen Seite erscheint das Alkali-salz einer Aminosäure; diese Carboxylgruppe machen sie verantwortlich für die eigentliche katalytische Wirkung bei der Spaltung; auf der sauren Seite erscheint ein Salz mit dem Kation des Ampholyten, und dies ist für die Affinität resp. die spezifische Bindung an das Substrat verantwortlich. S. ist also eine schwache Säure und auch ihre Verbindung mit Saccharose ist eine schwache Säure; nur die undissociirten Anteile dieser Enzym-Substratverbindung zerfallen, wie schon im H. W. Allg. Teil ausführlich dargestellt worden ist (s. a. **171)**). MYRBÄCK **176)** hat die Dissoc.-Verhältnisse der Saccharase erneut und sehr exakt untersucht und kommt ebenfalls zu der Überzeugung, daß die basische Natur durch eine Aminogruppe bedingt ist. Hemmende Stoffe können sich also ebensowohl an die Aminogruppe wie an das Carboxyl anlagern (s. u.).

Bei allen diesen Erwägungen bleibt nun aber die Frage offen, inwieweit diese zunächst rein elektrochemischen Eigenschaften auf den ganzen Symplex resp. das Pheron zu beziehen sind, inwieweit etwa das Agon selbst eine amphotere Substanz mit einer Aminosäuregruppirung ist. Die exakten Untersuchungen der EULER'schen Schule über die Hemmungen durch Fermentgifte, auf die wir im Einzelnen § 320 zurückkommen werden, sprechen eigentlich eher dafür, daß diese Wirkungen direkt auf das Agon gerichtet sind. So z. B. die überaus energische Wirkung sehr kleiner Mengen freier Halogene, da z. B. Jod bei ein Mol auf 20000 g Enzym die Wirksamkeit um 40 % herabsetzt (**175, 176**), wobei eine anscheinend stöchiometrische Verbindung zwischen Jod und

---

174) ***R. Willstätter***, Zur Frage der proteinart. Natur der Sacch. Ber. Chem. Ges., **59**, 1591 (1926). — 175) ***H. v. Euler***, ***K. Josephson***, Inakt. der Sacch. durch Halogen. Zs. phys. Chem., 127, 99 (1923). — 176) ***K. Myrbäck***, Verbind. einiger Enz. mit inaktivier. Stoffen. ebd. **158**, 160; **159**, 1 (1926). S.A.

S., eine Jodsaccharase entsteht mit fest umgrenzter Affinität zum Substrat, so daß Myrbäck hier eine wahrhafte Substitution des Jods in das Molekül des Enzyms annimmt. Verbindungen anderer Art, nämlich reversible Verbindungen als Salze oder Komplexsalze hat man bei den Schwermetallen anzunehmen; hier bindet sich Hg an die basische Gruppe, Ag an das Carboxyl (Myrbäck **176)**); ebenfalls an die Aminogruppe binden sich die „Alkaloidreagentien" wie Pikrinsäure, Phosphor-wolframsäure etc. Wieder anders verläuft die Nitrit-vergiftung der S., hier handelt es sich wohl sicher um eine irreversible Ausschaltung der für die Enzymwirkung unentbehrlichen Aminogruppe. Saccharose schützt vor dieser Vergiftung ebenso wie vor der mit Hg, weil sie sich selbst eben an diese Aminogruppe bindet und sie somit abdeckt. Alle diese Beobachtungen sprechen also für eine Aminosäure im Agon selbst; wir können nur nicht entscheiden, ob nun diese Aminosäure oder dieses Polypeptid seinerseits auf einem Protein als Pheron ruht, oder ob ein Protein selbst zugleich Agon und Pheron ist in dem Sinne, daß eben dies Protein nicht angelagert, sondern eingelagert in die Kette selbst eine spezifische Wirkgruppe enthält, wie dies heute wieder für Urease, Pepsin, Tryptase diskutirt wird, und wie es über das engere Fermentproblem hinaus auch für gewisse Hormone und Vitamine diskutirt wird, so z. B. für Insulin, die Hormone der Hypophyse etc. Auch bei diesen finden sich solche, die augenscheinlich nur in Verbindung mit einem kolloiden Träger wirken, die deshalb in ihrer Natur sich den Fermenten nähern und von v. Euler neuerdings als Vitazyme resp. Hormozyme bezeichnet werden. In dieser Gruppe sind ja auch mit fast völliger Sicherheit beide angedeuteten Fälle realisirt: das Insulin ist ein hohes Polypeptid mit eingebauter spezifischer Wirkgruppe oder wohl eher mehreren solchen Gruppen (**176a)**). Dagegen ist das „gelbe Ferment" zweifellos so gebaut, daß die bekannte Wirkgruppe des phosphorylirten Lactoflavins (vgl. S. 111) nur dann als Enzym wirkt, wenn sie auf einem Proteinträger ruht.

Die Annahme, daß wahrscheinlich einige der wichtigsten genannten Vergiftungserscheinungen auf direkte Reaktion der Stoffe mit dem Agon in rein chemisch-stöchiometrischen Sinne zu beziehen sind, wird weiterhin gestützt durch den auf demselben Wege erfolgten Nachweis einer reagirenden freien Carbonyl-gruppe. Die Giftwirkung sog. Aldehydreagentien, speziell der Amine, ist längst bekannt, und Myrbäck hat den Nachweis geführt, daß hier die ganz bekannte Reaktion der Amine mit Carbonylen zu den Schiff'schen Basen statthat, wobei wieder eine Inaktivirung auftritt, während andererseits die Reaktion völlig reversibel ist. Auf grund der Untersuchung weiterer Carbonyl-reagentien kommt Myrbäck zu der Vermutung, daß diese für die Wirksamkeit der S. absolut nötige freie Carbonylgruppe einem aldehydischen Zucker angehört. Hier wird man kaum noch annehmen können, daß es sich um eine Reaktion mit dem Pheron handelt, sondern diese Gruppe scheint doch wohl dem Agon selbst anzugehören. So nähern wir uns hier einer wenigstens teilweisen Erkenntnis der chemischen Natur der S., wenn auch natürlich alle diese Schlüsse erstens noch recht allgemein gehalten, zweitens nur indirekt gezogen sind. Von einer vollen deskriptiven Chemie der S. sind wir sogar bei diesem so glänzend untersuchten Enzym noch weit entfernt. Wir kennen exakt weder die Wirkgruppe noch den eigentlichen Träger, und auch wenn wir gewisse Dinge als sicher annehmen, noch nicht das Verhältnis zwischen beiden dahingehend, ob die Wirkgruppe nur an den Träger angeheftet oder in ihn eingebaut ist.

176a) ***W. Dirscherl***, Schwefelhaltige Verbindungen. Hb. der Bioch. Erg. Werk, Bd. I, S. 195 Jena 1933.

§ 317. **Äussere Eigenschaften.** Hier ist gegenüber dem H. W. nur sehr wenig nachzutragen. Die Diffusion durch Kollodiummembranen ist nach NELSON 177) bei ph = 4,6 viel geringer als bei ph = 6,7. Sehr reine S.-Lösungen zeigen ein Absorptions-Spektrum mit mehreren Einzelbanden, z. B. bei 260 mμ (ALBERS l. c. 172a); jedoch ist eine Deutung noch nicht möglich.

Die Haltbarkeit in wäss. Lösung (Autolysesaft) erstreckte sich auf 19 Jahre (NEUBERG u. KOBEL 178)). Indessen tritt beim Altern ein Aktivitätsverlust auf, der nach ALBERS (l. c. 172a) begleitet wird von einer Verschiebung des Absorptions-spektrums nach stärkerer Absorption hin, was er auf eine Aggregirung der Trägerteilchen zurückführt.

Beständigkeit im Tierkörper: Injicierte S. verschwindet aus dem Blute nach NOGAKI 179) erst sehr schnell, die Konz. war nach 2 h 50 %, nach 5 h 33 % der Anfangskonz., dann langsam weiter; sie wird aber nicht zerstört, sondern in die Gewebe abgegeben und dort adsorbirt, in der Leber zu 20—30 %. Durch „Immunisirung" kann diese Adsorption in der Leber bis auf 60 % gesteigert werden. Blut in vitro zerstört S. kaum (180). Injicirte S. ist noch nach einigen Stunden nachzuweisen in Leber, Milz, Knochenmark und Galle, nicht im Harn. (ODA 181)).

Meßmethoden und Maßeinheiten s. H. W. § 140 und bei SCHNEIDER H. W. Bd. III.

Für seine allgemeine Berechnungsmethode (§ 307) gibt WEIDENHAGEN speciell die S. betreffend zur Umrechnung folgendes an (cit. n. l. c. 2, S. 451):

Der Saccharasewert nach WILLSTÄTTER ist die Zahl der Einheiten in 50 mg des nach den Bedingungen von SULLIVAN und THOMPSON gemessenen Enzyms. Dem entspricht jetzt der unter Normalbedingungen gemessene **β-h-Fructosidasewert,** welcher die Zahl der Einheiten in 1 g Substanz angibt. Beide sind durch dieselbe Beziehung, welche schon von WILLSTÄTTER c.s. (l. c. 114) für den Saccharasevergleichswert ermittelt wurde,

β-h-Fructosidasewert = 166 × Saccharasewert

verknüpft. Für die verschiedenen Einheiten ergibt sich infolge der unterschiedlichen Bezugsmengen (1000 mg und 50 mg) die Beziehung

β-h-Fructosidaseeinheiten = 8,3 × Saccharaseeinheiten

Zur analytischen Bestimmung der Zucker schlagen an Stelle der polarimetrischen Messung SUMNER u. HOWELL 181a) die Messung mit Hilfe von Dinitro-salicylsäure vor, die schnell und genau sein soll.

4) Einwirkung äusserer Faktoren.

a) Temperatur, Strahlenwirkung.

§ 318. Das Verhalten der S. beim **Erwärmen** ist schon früher exakt untersucht worden (H. W. S. 560); wesentlich Neues ist nicht zu berichten. Über eine größere Empfindlichkeit der „Raffinase" bei 60° berichtet NELSON 182). Der Temp.-Koefficient für Raffinosespaltung durch Oberhefe (frei von Melibiase) ist 1,7—1,9, unabhängig

---

177) ***J. M. Nelson, A. H. Palmer,*** Diffus. of yeast invert. etc. Jl. of Biol. Chem., **87,** 1 (1930). — 178) ***C. Neuberg, M. Kobel,*** Klein. Mitteil. (Saccharase). Bioch. Zs., **238,** 226, (251) (1931). — 179) ***S. Nogaki,*** Schicksal der Hefensacch. im Tier-Org. Zs. phys. Chem., **142,** 97 (1925). — 180) ***A. Samysslov,*** Schicksal der Invert. im ... Organismus. Bioch. Zs., **164,** 110 (1925). — 181) ***T. Oda,*** Parenter. Zufuhr von ... Invertin. Jl. of Biochem., **9,** 383 (1928). — 181a) ***J. B. Sumner, St. F. Howell,*** Determ. of sacchar. activ. Jl. of Biol. Chem., **108,** 51 (1935); BPh **86,** 312. — 182) ***J. M. Nelson, Ph. Papadakis,*** Inactiv. of invert. etc. Jl. of Biol. Chem., **80,** 163 (1928).

vom ph (182a). Eine Aktivirung durch Erwärmen beobachtete VON EULER 183) bei einer gelösten S. unmittelbar nach Elution von Tonerde und Dialyse; sie betrug bis 40 % als Funktion der Temperatur, jedoch ist dies keine allgemein reproduzirbare Erscheinung.

Bei S. von *Penicillium* sah DOBY 184) leichte Verschiebungen nach oben, von 50 auf 55° bei reichlicher N-Nahrung; bei N-Mangel Ansteigen der Temp.-Konstante der Wärme-inaktivirung. In konz. Lösungen von Saccharose fand AUDEN 185) erhöhte Resistenz gegen Temperatur, bei 70 % liegt das Optimum bei 65—70°. Kritisches Inkrement des Prozesses je Mol in gcal. E ≐ 20500 — 168 t.

Ultraviolette Strahlen schädigen stark, besonders bei 270 mμ (GORBACH 186)). Die Inaktivirung ist unabhängig von Anwesenheit von Sauerstoff resp. Ozonbildung; der ph ist nur von geringem Einfluß, immerhin ist die Wirkung am schwächsten bei ph = 7. Die Inaktivirung geht nach Aussetzen der Bestrahlung weiter bis zur völligen Vernichtung (187). Bei Rohextrakten (gealterte Autolysate) tritt auch eine Aktivirung auf, wohl wegen der Zerstörung hemmender Begleitstoffe; bei reineren Präparaten, schon nach Dialyse, kommt sie nicht vor (188). Sie ist am besten durch mehrfache kurze Bestrahlung beim Neutralpunkt zu erzielen.

Die wirksamste Wellenlänge entspricht der des Tryptophans. GORBACH c. s. 186) greifen deshalb wieder auf die Vorstellung zurück, daß Tryptophan ein essentieller Bestandteil des Systems S. ist, und daß die Strahlenschädigung eben auf seiner Zerstörung beruhen soll. Indessen hat ALBERS (l. c. 172a) den Befund von WILLSTÄTTER erneut gestützt, daß Tryptophan nichts mit der Aktivität der S. zu tun hat (§ 316). Wenn also GORBACH angibt, daß vorgeschaltete Lösungen von Tryptophan die S. gegen UV-Strahlen schützen, so liegt das eben an dem wohl ganz zufälligen Zusammentreffen, daß grade Tryptophan die so schädlichen Wellenlängen um 270 mμ absorbiert und so nicht an das Enzym gelangen läßt. Hefengummi, das in dieser Gegend nicht absorbirt, schützt garnicht.

Radiumstrahlen (HUSSEY 189)) und zwar β, wirken bei gleichen Bedingungen ebenso wie auf Proteasen, d. h. im allgemeinen bei konstantem Volumen konstant nach Wirksamkeit des Präparats × Zeit ($P_a \cdot t = W$) auf den Logarithmus der Konz. des aktiven Enzyms ($\log Q - \log Q_0 = W$). Die Wirkung ist nach BONINO 190) bei Konzz. des Radiumpräparaten von 10^{-8} — 10^{-11} abhängig von dessen Konz., bei höheren (10^{-7}) dagegen hauptsächlich von der vorhandenen Aktivität des Enzyms. Hauptwirkung haben die α-Strahlen. Einige Tage aufbewahrte Hefelösung ist unempfindlich geworden; vielleicht geht ein gegen Radium empfindlicher Teil des Enzyms in dieser Zeit spontan zu grunde.

b) Chemische Einflüsse.

§ 319. **Optimaler ph.** Der opt. ph der echten Fructosacch. der Hefen von ca. 4,5 ist immer wieder bestätigt worden; auch für die Raffinose-spaltung durch Oberhefe (ISAJEV l. c. 182a). Dagegen zeigen sich sehr erhebliche Verschiedenheiten, wenn man die

---

182a) ***V. I. Isajev,*** Raffinase. (Tschech., Resumé französ.) Chem. Listu, **21,** H. 3—5 (1927). S.A. — 183) ***H. v. Euler, J. Lindstål,*** Aktiv. Steig. gel. Sacch. Svensk. Kem. Tidskr., **37,** 18 (1925). — 184) ***G. v. Doby,*** Sacch.-Konz. in Penic. bei N-Mangel. Zs. phys. Chem., **213,** 71 (1932). — 185) ***H. A. Auden, E. R. Dawson,*** Hydrol. of conc. sugar sol. etc. Biochem. Jl., **25,** 1909 (1931). — 186) ***G. Gorbach, K. Lerch,*** Einfl. des ultraviol. Lichtes auf die Saccharase. Bioch. Zs., **219,** 122 (1930); **235,** 259 (1931). — 187) ***Ders., H. Pick,*** (***D. Kimovec***), Ultraviol. Inakt. von Sacch. Sitzb. Akad. Wien II b., **141,** 397, 407 (1932). — 188) ***Ders., H. Ruess,*** Aktiv. der Hefesacch. durch UV-Licht. Bioch. Zs., **271,** 338 (1934). — 189) ***R. G. Hussey, W. R. Thompson,*** Eff. of rad. . . . on sol. of invert. Jl. of gen. Phys., **9,** 211 (1925). — 190) ***G. A. Bonino, V. Mazzucchetti,*** Az. del radio sul invert. Arch. di Biol., **2,** 81 (1925); BPh **37,** 884.

Sacch. der anderen Kryptogamen untersucht. Ihre ph-Optima sind grundsätzlich nach alkalisch verschoben bis gegen 6. Man hat versucht, diese Abweichungen mit dem Problem der Glucosacch. zusammenzubringen in dem Sinne, daß der höhere ph auf diese Glucosidase deuten sollte; aber das Alles ist noch völlig unklar; jedenfalls scheint es auch Fructosidasen zu geben, die bei einem höheren ph maximal wirken als die der Hefen. Im übrigen sind auch hier wieder die einzelnen Beobachtungen verschieden bei denselben Organismen, was durchaus nicht notwendig auf Versuchsfehler zurückzuführen ist: wie in beinahe allen anderen Punkten scheinen die Enzyme der Schimmelpilze auch darin wirklich zu differiren. Phanerogamen-sacch. hat (meist) noch höhere ph-Optima, und die Bakterien die höchsten. Es handelt sich hier um biologische Regelmässigkeiten (HOFMANN **191)**). So fand IWANOFF (l. c. 136) bei *Asp. niger* 5,2, JOSEPHSON (l. c. 130) bei *Asp. flavus* 6,0; eine so erhebliche Differenz, daß man sie vielleicht wirklich auf eine Glucosacch. zurückführen muß; HOFMANN **191)** fand aber bei *Asp. niger* wieder nur 4,9.

HOFMANN stellt eine Tabelle der ph-Opt. zusammen, die ich hier etwas verkürzt wiedergebe. Die Zitate sind z. T. ältere Angaben, z. T. in den §§ 312 ff. zu finden; bzgl. *Phanerogamen* s. aber DOBY § 313.

ph-Optima der pflanzlichen Saccharasen.

Gruppe	Art	ph	Autor
Bakterien	Pneumokokken	7,0	AVERY
	Coli	7,0	KARSTRÖM
	Sulfatase-Bakt.	6, 5	E. HOFMANN
Hefen	Untergärige Hefe	4,2—4,6	SÖRENSEN, MICHAELIS
Spalthefen	Schizosacchar. octosporus u.a.	4,5—5,0	HOFMANN
Schimmelpilze	Asp. niger	5,2	IWANOFF c.s. (l. c. 136)
	do.	4, 9	HOFMANN
	Asp. Oryzae	5,2	do.
	Penicillium	5,0	EULER c.s.
Phanerogamen	Solanum Indicum	6,0	TAUBER u. KLEINER
	Blätter versch. Bäume	4,5—6,5	BLAGOVESCHENSKI

Auf die Bedeutung der Untersuchung der **ph-Aktiv.-Kurven** für die Erkenntnis der amphoteren Natur der S., wie sie schon ältere Untersucher seit MICHAELIS und neuerdings wieder besonders v. EULER u. JOSEPHSON (l. c. 170, 171) nachgewiesen haben, ist bereits § 316 eingegangen worden. Die Untersuchungen führen zu dem Ergebnis, daß S. eine schwache Säure ist mit einem Carboxyl und einer basischen Aminogruppe; erstere wird verantwortlich gemacht für die katalytische Spaltung, letztere für die Affinität resp. die Bindung an das Substrat. Diese Affinität zur Saccharose steigt von

191) ***E. Hofmann***, Bezieh. zw. [H˙] und Abkunft verschied. Carbohydrasen. Bioch. Zs., **275**, 320 (1935). S.A.

Abgeschlossen: 2. 9. 35. Ber. Phys. 86, H. 7/8.

stark saurer Reaktion bis zum optimalen ph und verändert sich dann nicht weiter. EULER u. JOSEPHSON **192)** geben weiter an, daß die Affinität zu den Spaltprodukten ebenfalls vom ph abhängt, damit also auch die hemmende Wirkung der Spaltprodukte. Bei sehr hoher Konz. an Saccharose tritt neben der unten zu besprechenden Verlangsamung der Reaktion auch eine Verschiebung der ph-Aktiv.-Kurve nach alkalisch ein, anstelle des scharfen Maximums tritt eine breite optimale Zone (INGERSOLL, l. c. 205/6).

Über die allgemeine Wirkung von **Neutralsalzen** ist auch heute noch nicht viel bekannt. Soweit es sich um eiweißfällende etc. Salze handelt, dürfen wir wohl mit SCHÜRMEYER **193)** hauptsächlich mit kolloid-chemischen Wirkungen auf die Trägersubstanzen rechnen; aber daneben gibt es nach seiner Meinung wohl auch noch spezifische Wirkungen auf das Agon selbst, wie wir sie auch bei anderen Enzymen für Fluoride etc. finden, bei Amylase auch für andere Salze. Nach SCHÜRMEYER wirken zweiwertige Kationen stärker hemmend, während sie andererseits einwertige „entgiften". So ist z. B. eine Mischung von Ca: Na 1: 20 fast ohne Wirkung, ähnlich wirken Mg, Ba, La, nicht Co, Ni. Für eine hauptsächliche Wirkung auf den Träger spricht auch, daß eiweißfreie S. Ionen gegenüber unempfindlich ist, Zusatz von Protein die Empfindlichkeit hervorruft. Auf der sauren Seite gibt es überhaupt keine Salzhemmung. NELSON **194)** schließt sich im Allgemeinen diesen Ansichten an. Beim isoelektr. Punkt des Enzyms ist die hemmende Wirkung der Neutralsalze minimal und unspezifisch. Auf der alkalischen Seite ist die Hemmung größer und spezifisch, sie folgt der lyotropen Reihe, d.h. sie ist eine kolloidchemische Wirkung auf den Träger.

So ergibt sich eine Hemmung anwachsend für LiCl, NaCl, KCl, KBr, KJ, $BaCl_2$. Alkohol und Zucker hemmen umgekehrt am stärksten beim isoel. Punkt.

Nach DOBY **195)** wirkt NO_3' bis zu n/10 aktivirend, höhere Konzz. hemmen ebenso wie Cl'. Salzkonzz. zwischen m/1000 und m/1 wirken meist schädigend, wobei die Kationen den Dispersitätsgrad zu verändern scheinen.

Schweres Wasser (50—97,4 % D_2O) wirkt nach STEACIE **196)** bei 30,25° um etwa 25 % verzögernd auf die Hydrolyse durch S. Wirksam ist nicht die Verschiedenheit der Masse, sondern der auch sonst beobachtete Anstieg der Aktivirungswärme.

§ 320. Aktivirung und Hemmung. Die Einwirkung chemischer Stoffe auf die Tätigkeit der S. ist besonders eingehend und quantitativ exakt untersucht worden, nicht nur wegen des Interesses an der Kinetik des Enzyms, sondern vor allem im Hinblick darauf, echte chemische Reaktionen im stöchiometrischen Sinne aufzufinden, die Aufschlüsse über die Natur des Fermentes als Stoff geben könnten. Darauf haben wir bereits § 316 vorschauend hingewiesen. Es finden sich sozusagen „Reagentien" auf eine Aminogruppe, ein Carboxyl und eine Carbonylgruppe, die vielleicht einem Zucker angehört. Danach kann man die Beeinflussungen durch chemische Stoffe ungefähr sachlich gruppiren. Wir finden außer den üblichen und ziemlich unspezifischen Beeinflussungen der Reaktionsgeschwindigkeit einerseits (z. B. Wasserentziehung in konz.

---

192) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Acid. Beding. der enz. Rohrz.-Spalt. Zs. phys. Chem., **155,** 1 (1926). — 193) ***A. Schürmeyer,*** Ionenantag. bei den Systemen Invert.-Eiweiß etc. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER), **208,** 595; **210,** 755 (1925). S.A. — 194) ***J. M. Nelson, A. H. Palmer,*** Some prop. of yeast invert. Jl. of Biol. Chem., **92,** LXXVIII (1931). — 195) ***G. v. Doby c.s.,*** Ionenaktiv. von Pflanzenenz. in Abh. von der Ernähr. Bioch. Zs., **178,** 139 (1926); **196,** 89 (1931); **213,** 71 (1932). — 196) ***E. W. R. Steacie,*** Enzym. Rohrz. Invers. in schwerem W. Zs. physikal. Ch. B. **27,** 6 (1934).

Zuckerlösungen), sowie den überall vorhandenen aber hier besonders interessanten Beeinflussungen durch Affinitätsablenkung durch die Spaltprodukte und verwandte Zucker andererseits noch folgende Gruppen von Hemmungen:

1) Wirkung auf das Carboxyl durch Salzbildung.
2) Wirkung auf die Aminogruppe durch Komplexbildung.
3) Ausschaltung der Aminogruppe durch Abspaltung oder feste Bindung.
4) Einflüsse auf den Kohlenstoffkern des Ferments selbst (für Jod angenommen, s. u.).

Nachdem wir dies allgemein festgestellt haben, erscheint es aber doch sachlich zweckmäßiger, die Wirkungen nach den Stoffgruppen selbst anzuordnen, weil die Art der Wirkungen an sich nicht immer feststeht und auch bei derselben Gruppe chemischer Stoffe verschiedene Modi vorkommen, so bei den Schwermetallen.

Freie Halogene. Die Inaktivirung durch Jod ist von v. EULER c.s. zuerst exakt untersucht worden, wie bereits im H. W. S. 563 berichtet wurde. Versuche mit Brom s. l. c. 175. Freies Chlor hat in demselben Sinne zuerst MYRBÄCK (l. c. 176) untersucht.

Chlor ist ebenso giftig wie Brom, kleinste Mengen haben gar keine Wirkung, wahrscheinlich weil sie von gleichgiltigen Begleitstoffen abgefangen werden. 0,01 mg. auf 2 ccm hochwertiger S. bewirkten Abnahme um 25 %, 0,05 mg um 90 %. Die Wirkung ist sehr schnell, ohne meßbare Inkubationszeit, eine Verbindung von S. mit Chlor wie bei Jod bildet sich nicht.

Für Jod hatten die älteren Versuche VON EULER's (l. c. 175) zu der Feststellung geführt, daß es sich zwar um eine irreversible, durch Thiosulfat nicht aufhebbare Vergiftung handelt, daß sie aber langsamer verläuft und nicht zu einer totalen Vernichtung des Enzyms führt. Es erfolgt sehr schnell eine Abschwächung um rund 50 %, dann erfolgt eine langsame weitere Abschwächung.

MYRBÄCK (l. c. 176) zeigte, daß es sich hier um zwei Reaktionen handelt. Momentan erfolgt eine Abschwächung von rd. 40 %, die darauf beruht, daß sich ein neuer Stoff bildet, eine **Jod-saccharase**, die folgende langsame Weiterwirkung beruht auf sekundären Reaktionen. Diese hängen stark vom ph ab, sind bei ph = 4—4,5 am geringfügigsten. In den Versuchen MYRBÄCK's mit größeren Jodmengen verliefen diese Prozesse, also die sekundäre Einwirkung von Jod auf die Jod-saccharase, viel schneller als bei EULER u. JOSEPHSON und anscheinend monomolecular. Die Inaktivirungs-konstante bei optimaler Acidität war $k_c = 30 . 10^{-4}$. Durch diese Reaktionen wird die Aktivität allmählich völlig vernichtet.

Interessanter ist die neue Enzym-verbindung Jod-saccharase mit einer konstanten Aktivität von 60 %. Sie hat dieselbe ph-Aktiv.-Kurve wie die S. selbst und nach MYRBÄCK auch dieselbe Affinität. Jod greift also nicht an den substratbindenden Gruppen an, was auch dadurch gestützt wird, daß überschüssiges Substrat nicht schützt. Wahrscheinlich tritt das Jod substituirend in einen Ringkern des eigentlichen Moleküls der S. ein. Auch die zweite Phase greift nicht an der substratbindenden Gruppe an und bedeutet vielleicht den langsameren Eintritt eines weiteren Jod-atoms mit der Folge völliger Inaktivirung. Thiosulfat bewirkt seltsamer Weise eine schnellere Aufnahme von Jod mit Inaktivirung, wahrscheinlich durch intermediäre Bildung besonders reaktionsfähiger Jodverbindungen, Überschuß von Thiosulfat kann teilweise diesen Prozeß rückgängig machen.

Osmium-tetroxyd, das ja ähnlich wie die Halogene durch starke Oxydation wirkt, inaktivirt S. zu 1 mg auf 2 ccm S. in 90 Min. zu 65 %, um so schneller, je höher die Acidität.

Freie **salpetrige Säure** zerstört die S. vollständig, und zwar durch direkte chemische Ausschaltung der Aminogruppe. Daß hier der Angriff ganz anders wie bei den Halogenen durch direkten Angriff auf die die Affinität vermittelnde Gruppe erfolgt, zeigt die Tat-

sache (MYRBÄCK), daß die Zucker, deren Bindung an das Enzym bekannt ist, dies gegen die Vergiftung schützen, indem sie die empfindliche Aminogruppe abdecken. So wirken Saccharose, Glucose, Fructose, nicht Maltose und Lactose. Es wirkt nur die freie Säure, Nitrite sind unwirksam.

Ebenfalls durch direkte Reaktion mit der basischen Aminogruppe wirken die anorganischen Komplex-säuren, die als **Alkaloidreagentien** bekannt sind, wie Phosphor-wolfram- und Kieselwolframsäure. Sie inaktiviren weitgehend, und ihre direkte Beziehung zur bindenden Gruppe wird ebenfalls dadurch erwiesen, daß auch hier Zucker genau so schützend wirken. Ebenso wirken auch organische Säuren, soweit sie eben mit der Aminogruppe wenig dissociirte Salze geben, so Picrinsäure.

Komplizirter ist die Wirkung der **Schwermetalle** insofern als hier sowohl einfache Salzbildungen an der Carboxylgruppe wie auch Komplexsalz-bildungen an der Aminogruppe in Frage kommen. Jedenfalls handelt es sich auch hier um wahre chemische Reaktionen, die zu unwirksamen Verbindungen führen, nicht zu einer Zerstörung des Ferments, denn die Hemmungserscheinungen sind reversibel. Diese einfachen Reaktionen sind aber nur bei hochwertigen reinen Enzymen derart quantitativ zu verfolgen, wie dies VON EULER c.s. (H. W. S. 563) getan hat, denn bei lebenden Zellen wird z. B. bei Ag die 200 fache Menge verbraucht wie beim Reinenzym, weil hier das Ag ganz überwiegend an allerlei andere Stoffe gebunden wird. (*l. c. 248, 249*, **197**), **198**)). Die exaktesten Untersuchungen liegen auch hier von MYRBÄCK **199**), **200**) vor, der die Verhältnisse überall möglichst quantitativ verfolgt und in Kurven niedergelegt hat.

Die Vergiftung der S. durch Ag beruht darauf, daß die S. als Säure mit dem Ag ein ganz normales, aber schwach dissociirtes Salz bildet. Es wird also das vom Ampholyten abdissociirte H-Ion durch ein fester gebundenes Ag-Ion ersetzt, und da das H-Ion für die katalytische Wirkung unentbehrlich ist, so erfolgt Inaktivirung.

Da die bindende (basische) Gruppe dabei nicht beteiligt ist, so muß diese Reaktion von der Substratkonz. unabhängig sein, was der Versuch erweist. Die Vergiftung ist völlig reversibel, z. B. durch H_2S, die Kurve Inaktivirungsgrad-Giftmenge ist eine Dissociations-kurve.

Dementsprechend nimmt die Inaktivirung mit steigendem ph zu: sie beträgt bei gleichen Ag-Mengen (10^{-6} n. $AgNO_3$) bei 4,57 25 %, bei 6,36 97 %.

Die Vergiftungskurven gehen dem absteigenden Ast der ph-Aktiv.-Kurve parallel. Es herrscht das Gleichgewicht:

$$\frac{[Ag^{\cdot}]\ [E']}{[AgE]} = K_{Ag}.$$

Die Anzahl der Ag-bindenden Aequivalente, also aktives Enzym, diesem noch nahe verwandte Stoffe, wie etwa unwirksames Enzym, und andere Ag-bindende Begleitstoffe zusammen beträgt auf die Gesamtmenge des Präparats bezogen $0{,}6 \cdot 10^{-6}$.

Es stellt also diese Zahl nur einen Höchstwert dar; sie ist deshalb nur um so interessanter, weil sie Rückschlüsse gestattet auf die ungemein geringen Mengen wirksamen Enzyms und darauf, daß diese Vergiftung tatsächlich wohl direkt am Agon ansetzt, wie wir § 316 angedeutet haben.

---

197) ***H. v. Euler, E. Walles,*** Inaktiv. von Sacchar. in frischer Hefe durch Silbernitrat. Zs. phys. Chem., 132, 167 (1924). — 198) ***H. v. Euler,*** Biokatalysatoren, Stuttgart 1930; s.a. Ang. Chemie, **1932**, 220. — 199) ***K. Myrbäck,*** Inaktiv. der Sacchar. durch Schwermetalle. Arkiv för Kemi, **8**, Nr. 29, 1. — 200) ***Ders.,*** Verbind. ein. Enz. mit inaktivir. Stoffen. Zs. phys. Chem., **158**, 160 (1926). S.A.

Daß die Bindung an ein wahres Carboxyl in Salzform vor sich geht, läßt sich natürlich nicht präparativ erweisen, sondern eben nur aus den Kurven wahrscheinlich machen. Es käme außer Aminosäuren noch Phosphorsäure in Nucleotid-bindung in Frage, die SH-Gruppe scheidet aus. Cu, Pb, Zn, Cd verhalten sich genau ebenso, zeigen auch etwa die gleichen Inaktivirungskonstanten. Dagegen sind Ni, Co, Mn und die dreiwertigen Metalle Fe, Al, Cr fast ohne Wirkung, da sie nur eine sehr geringe Affinität zum Enzym haben. Da dies diejenigen Elemente sind, welche die besten Sorptionsmittel für S. liefern, so kann die Sorption nicht durch dieselbe Gruppe des Enzyms vermittelt werden, wie die Vergiftung. In der Tat wird Ag-Saccharase leicht adsorbirt, sogar leichter als S. selbst. Es sei dazu bemerkt, daß auch die basische Gruppe nicht an der Sorption beteiligt sein kann, da ja S. in sorbirter Form wirksam ist. Auch die Hg-Saccharase ist sorbirbar, trotzdem Hg an der basischen Gruppe ansetzt.

Ganz anders verhält sich nun **Hg.** Hier ist die bevorzugte Stelle der Bindung, wenn auch vielleicht nicht die alleinige, die basische Gruppe. Auch diese Vergiftung ist durch H_2S völlig reversibel; aber sie wird stark beeinflußt durch die Substratkonz. und ist insofern vom ph weniger abhängig, als sie gegen die alkalische Seite des Optimums hin zwar auch zunimmt, aber in der Gegend des Optimums selbst fast unabhängig vom ph ist: Hemmung bei 2,80 und 4,57 fast gleich, etwa 60 %. Das Hg wird sehr wahrscheinlich in Form eines inneren Komplexsalzes an die Aminogruppe gebunden.

Dafür spricht, daß Hg das Enzym gegen die Vernichtung durch HNO_2 schützt, während umgekehrt Ag nicht imstande ist, das Enzym gegen Hg zu schützen. Die Hg-Vergiftung muß sich also an einer Gruppe abspielen, die weit von der mit Ag reagirenden Gruppe, dem Carboxyl, entfernt ist. Die Verbindung der Aminogruppe mit dem Hg ist reversibel, man kann sie z. T. durch Zusatz von Proteinen oder dergl. rückgängig machen. Dies kann auch im Enzympräparat selbst geschehen, was EULER u. SVANBERG schon früher als „Selbst-regenerirung" der S. aus der Hg-Vergiftung beschrieben haben (*l. c. 248*). Auch NaCN löst das Hg allmählich ab.

Organische Stoffe. Auch hier haben wir grundsätzlich zu unterscheiden die allgemein, sozusagen unspezifisch hemmenden Substanzen, wie sie überall in der Fermentlehre zu berücksichtigen sind, vor allem die kapillar-aktiven „narkotischen" Stoffe, die kolloidchemisch reagiren und dadurch die Fermentwirkung mehr weniger herabsetzen, von eigentlichen spezifischen Giften, die mit dem Enzymsystem als solchem, sei es mit dem Agon oder dem Pheron in direkte chemische Reaktion treten. Hierfür bieten sich bei der S. zwei Grundmöglichkeiten, nämlich die Reaktion mit der basischen Gruppe, also sehr wahrscheinlich der Aminogruppe, und die Reaktion mit der Carbonylgruppe, die vielleicht einem zuckerartigen Rest angehört.

In der ersten Gruppe finden wir wie immer die etwas verwaschenen und unsicheren Wirkungen, aber auch die der Aminogruppe sind nicht sehr ausgesprochen, außer wenn es sich um eine Salzbildung mit einer Säure handelt, die wie die oben erwähnten anorganischen komplexen Säuren schwer dissociable Salze bildet. Wir wollen diese Dinge kurz zusammenstellen.

Chloroform hat nach BONINO **201)** auf Reinpräparate kaum eine Wirkung, setzt bei frischen Hefe-extrakten die Geschwind.-Konstante erheblich herab. Diese Wirkung ist aber indirekt: sie beruht nur darauf, daß Chl. die Säuerung verhindert, die zur Einstellung des opt. ph der S. nötig ist, da bei Anwesenheit von Chl. der ph auf 6,0—6,2 stehen blieb. Je weiter

201) ***G. B. Bonino, V. Mazzucchetti,*** Az. del clorof. s. . . . invert. etc. Arch. di Biol., **2**, 71 (1925); BPh **87**, 883.

also der ph des Hefen-extraktes nach dem alkalischen zu vom opt. ph von 4,5 entfernt ist, desto stärker wird diese indirekte Hemmung. Ein Einfluß auf das Enzym selbst ist noch nicht untersucht. **Äthylen** ist ohne Einfluß (**202**).

Alkohol hemmt in stärkerer Konz., am wirksamsten beim isoelektr. Punkt des Enzyms (Nelson l. c. 194). Bei Raffinose-spaltung (Oberhefen) schwache Hemmung durch Chloroform, Toluol, Thymol nach Isajev (l. c. 182a). **Phenylharnstoff** hemmt nach Schürmeyer (l. c. 198) eiweißfreie S. nicht; nach Zusatz von Proteinen, am besten Globulinen, tritt die kapillar-aktive Wirkung als Hemmung ein.

Formaldehyd ist trotz seiner zweifellosen Reaktion mit der Aminogruppe zu einer Methylenverbindung ein sehr schwaches Gift, oder besser gesagt ein langsam wirkendes, wie schon Euler c.s. (*l. c. 248, 249*) beschrieben haben. Die langsame Inaktivirung ist am schwächsten beim opt. ph, nimmt nach alkalisch etwas zu, ebenso aber auch bei 2,9 (Myrbäck **200**)).

Da Myrbäck ohne Inkubation überhaupt keine Hemmung fand, so nimmt er an, daß sich immer nur eine kleine Menge inaktiver Methylen-aminosäure bildet, die als instabil wieder zerfällt und eine neue Wirkung ermöglicht. Diese Instabilität hängt eben vom ph ab, und zwar etwa ebenso wie die der S. selbst.

Mascré **203**) bestätigt die reversible Wirkung. Er gibt an, daß durch Formaldehyd Säureäquivalente frei werden, daß aber der gesamte Formaldehyd durch Dimedon wiedergewonnen werden kann. Nach seiner Ansicht handelt es sich überhaupt nur, um eine kolloidchemische Wirkung auf das Trägersystem in Form einer Dispersitätsverminderung, nicht viel anders wie bei Alkohol etc.

Hemmung durch hohe Zuckerkonzentration. Die Hemmung durch höhere Konzz. von Saccharose, die längst bekannt ist, gehört ebenfalls zu den sozusagen unspezifischen Hemmungen, da sie anscheinend in der Hauptsache auf rein physiko-chemische Ursachen zu beziehen ist. Mit der unten zu besprechenden spezifischen Hemmung durch Monosen etc. hat sie jedenfalls garnichts zu tun.

Die Hemmung beginnt bei etwa 5 %, sodann nimmt nach Ingersoll **204**), **205**) die Spaltungsgeschwindigkeit linear mit der Konz. ab, von 3,5—69 %.

Über die Ursache dieser Hemmung zieht sich seit langer Zeit eine Diskussion hin. Ältere Untersucher, so Colin u. Chaudun (H. W. S. 261) hatten angenommen, daß die Erhöhung der Viscosität die Hauptursache der Hemmung sei. Ingersoll sieht aber die Ursache allein in der Abnahme der Konz. des Wassers. Reine Erhöhungen der Viskosität bis zu 20 % haben keinen Einfluß. (Seine Methode wird von Achalme **206**) abgelehnt). Vielleicht liegt aber auch eine noch nicht erkannte direkte Wirkung der Saccharose in hoher Konz., also im Überschuß vor. Diese Art der Hemmung gilt nur für Saccharose an sich; sobald einmal Invertzucker vorhanden ist, tritt dazu die spezifische Hemmung durch die Spaltprodukte. Sie binden das Enzym durch wahre Affinität und vermindern so seine aktive Masse; aber es liegen auch hier irgend welche Besonderheiten vor, denn der Einfluß zugesetzten Invertzuckers ist doch anders, als wenn einfach weniger S. anwesend wäre. Sehr seltsam ist der Einfluß von α-Methylglucosid: es bewirkt Aufhebung der Hemmung durch überschüssige Saccharose, so daß die Reakt. Geschw. von 5—35 % konstant bleibt. Anscheinend liegt dies daran, daß Methylglucosid, das ja nicht (s. u.) durch Affinität hemmt, sondern nur auf die Zerlegungsgeschwindigkeit wirkt, bei niedrigeren Konzz. als solches stärker hemmt, bei höheren die schon gegebene Hemmung nicht mehr verstärkt, so daß beide Hemmungen zusammen eben etwa denselben Wert erreichen.

---

202) ***D. T. Englis, C. D. Zannis,*** Eff. of ethylen upon . . . invert. Jl. Amer. Chem. Soc., **52**, 797 (1930). — 203) ***M. Mascré, R. Paris,*** Act. du formol sur l'emuls. et l'invert. C. R., **196**, 438; Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 918 (1933). — 204) ***Ch. D. Ingersoll,*** Hydrol. of sucrose by invert. at high sugar conc. Diss. New York 1926. S.A. — 205) ***Ders.,*** Hydrol. par la sucrase du sacch. en sol. très conc. Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 264, 276 (1926). — 206) ***P. Achalme,*** A prop. de mém. de M. Ingersoll etc. (Saccharase) ebd. 565 (1926).

(vgl. dazu NELSON **223**)). Nach NELSON (l. c. 194, **207**) **208**)) ist die Hemmung am stärksten beim isoel. Punkt. Auch er führt sie im wesentlichen auf die Abnahme der Wasserkonz. zurück; bei unter 5 % überwiegt zwar die Bildung des Komplexes Rohrzucker-Enzym, so daß die R. G. ansteigt, aber selbst bei diesen Konzz. muß man schon der Abnahme der Wasserkonz. Rechnung tragen. Auch AUDEN (l. c. 185) bestätigt, daß die Viscosität keine wesentliche Rolle spielt. Ebenso wenig konnte KERTÉSZ **208a**) einen Einfluß der Viscosität finden. Weder Zusatz eines unwirksamen kolloiden Stoffes (Pectin) noch die Änderungen der Viscosität bei Änderung der Temperatur hatten eine lineare Beziehung zur Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit. COLIN c.s. **209**) lehnen dagegen die Argumentationen von INGERSOLL ab, sie geben aber nun selbst zu, daß die Viscosität allein nicht maßgebend ist, ebensowenig aber eine spezifische Hemmung durch Spaltprodukte, da Ersatz der Saccharose durch Lactose denselben Effekt hat. Die Sache bleibt nach ihrer Ansicht unaufgeklärt (s. a. l. c. 218).

Picrinsäure hemmt wie bereits erwähnt nach MYRBÄCK **200**) durch Bildung eines wenig dissociirten Salzes an der Aminogruppe. Der Grad der Vergiftung ist stark abhängig von der Substratkonz., sie setzt also an der bindenden Gruppe an. Die Vergiftungskurven sind aus dem sauren Aste der ph-Aktiv.-Kurve durch Parallelverschiebung entstanden.

Hochinteressant sind die Vergiftungen durch „**Carbonyl-reagentien**" wie **Amine**, da sie Rückschlüsse auf die chemische Natur des Agons in der S. zulassen (§ 316). Die älteren Versuche darüber sind im H. W. S. 564 bereits erwähnt (*l. c. 248, 256*). MYRBÄCK **200**) hat auch diese Erscheinungen exakt quantitativ bearbeitet und kommt zu dem Ergebnis, daß es sich hier tatsächlich um eine stöchiometrische Reaktion der Carbonylgruppe des Enzyms mit den Aminen zu SCHIFF'schen Basen handelt. Wie schon EULER u. MYRBÄCK (*l. c. 256*) gezeigt hatten, ist nur die freie Base giftig, weil nur sie gebunden wird, und MYRBÄCK hat dies nun durch Feststellung der Dissoc. Konstanten der aromatischen Amine genauer präzisirt. Je stärker die Base, desto stärker die Bindung an das Enzym, wie aus den berechneten Diss. Konst. der Verbindungen Enzym-Amin hervorgeht. Aus den ph-Kurven (für Anilin) geht weiterhin hervor, daß die S. bei jeder Acidität Amine gleich stark bindet, ob sie als Base oder Säure dissociirt oder undissociirt ist. Das will sagen, daß im untersuchten Gebiet die Gruppe, an die sich das Amin bindet, durch die Acidität nicht verändert wird. Die Vergiftung ist völlig reversibel, z. B. durch Zuckerzusatz bei ph = 3. (von 90 % zu 25 %). Aber auch andere Aldehyde wirken regenerirend, Ketone schwächer. Die Inaktivirung ist also eine durch das Massengesetz bestimmte Gleichgewichtsreaktion. Substratkonzz. haben keinen Einfluß von 0,058 bis 0,585. Die Vergiftung setzt also an einer anderen Gruppe an als die Bindung des Substrates, die Substrat-enzym-verbindung bindet das Amin noch mit derselben Affinität. Die Giftwirkung beruht darauf, daß nicht etwa die Verbindung Enzym-Substrat verhindert wird, sondern daß die Verbindung Amin-Enzym-Zucker nicht zerfällt.

Substitution in der Aminogruppe hebt die Giftigkeit auf (*l. c. 248*), Substitution im Kern ändert wechselnd, so ist p-Toluidin noch giftiger als Anilin und hat nach MYRBÄCK auch eine grössere Affinität. Die Diss. Konstanten für die Enzym-Amin-Verbindung $\frac{[\text{Aminbase}][\text{freies Enzym}]}{[\text{Amin-enzym-verbindung}]}$ sind: K . 10^4 bei Anilin = 3,3, bei p-Toluidin = 2,1, m-Toluidin

---

207) ***J. M. Nelson, H. W. Larson,*** Kin. of inv. act. Jl. of Biol. Chem. **73**, 223 (1927). — 208) ***J. M. Nelson, M. P. Schubert,*** Water conc. and ... hydrol. by invert. Jl. Amer. Chem. Soc., **50**, 2188 (1928). — 208a) ***Z. I. Kertész,*** Infl. of viscos. on invertase act. Jl. Amer. Chem. Soc. **57**, 345 (1935). — 209) ***H. Colin, A. Chaudun,*** Loi d'action de la sucrase etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 258 (1929); BPh **51**, 194.

0,9. Weiter wurden noch die entspr. Konstanten bestimmt bei den 3 Chloranilinen, Aminobenzoesäuren etc., die sich sehr verschieden verhalten.

Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten des Formaldehyds zu denselben Aminen in bezug auf die Abhängigkeit der Diss. Konst. von der Struktur der Amine führen MYRBÄCK zu der Annahme, daß die Carbonylgruppe in der S. keine gewöhnliche Aldehydgruppe ist, sondern einem Zucker angehört. In der Tat verhalten sich die betr. (12) Amine gegen Lactose wie gegen Saccharase, z. B. darin, daß immer die m-Verbindungen die größte Affinität haben, gleichgiltig ob sie stärkere oder schwächere Basen sind als ihre Isomeren. Auch die sehr starke Bindung von Phenyl-hydrazin an S. spricht für ihre Zuckernatur. Auch diese Vergiftung verläuft nur durch die freie Base, ist in saurer Lösung stark herabgesetzt. Die Diss. Konst. der Verbindung Saccharase-Phenylhydrazin ist K = 0,014. Semicarbazid, das mit Aldehyden stark, mit Zuckern kaum reagirt, wirkt nicht auf S., ebenso HCN sehr schwach. Aminoguanidin, das auf Aldosen stark wirkt, hemmt auch S., wieder nur als freie Base. Aus allen diesen Gründen glaubt MYRBÄCK an die **Zuckernatur des Agons der S.**

Ob die Vergiftungen mit **Alkaloiden** ganz oder z. T. auf denselben Ursachen beruhen, ist noch nicht genauer untersucht. Diese früher so intensiv bearbeitete Frage (H. W. S. 564) scheint überhaupt an Interesse eingebüßt zu haben, denn es sind mir nur wenige neuere Angaben zu Gesicht gekommen. Nach MEZZADROLI 210) hemmt besonders stark Strychnin, bei 0,05 % schon zu 70 %; bei 0,3 % zu 87 %. Chinin in denselben Konzz. nur 3,9 und 20,1 %, Coffein 2,7 resp. 4,76 %; alle Angaben beim ph-Opt. 4,25.

Genuine **Proteine** steigern nach NELSON 211) die Wirkung, aber nur bei Reinpräparaten und nur bei saurer Reaktion, ph < 4. Andere Kolloide, wie denaturirtes Eiweiß, Gelatine, Gummi arabicum, sind unwirksam, ebenso Tryptophan und Glycyl-glycin bei ph = 3. NELSON denkt an rein physikochemische Einflüsse durch das zugesetzte amphotere Kolloid; vielleicht handelt es sich aber um Zuführung von Pheron-Ersatz, wie dies KRAUT bei den Lipasen festgestellt hat, wo die bekannte Aktivirung durch Albumin etc. nicht eigentlich eine Aktivirung eines vorhandenen Enzyms, sondern eine Synthese neuen aktiven Enzyms aus vorhandenem überschüssigen Agon bedeutet. Wahrscheinlich um etwas Ähnliches handelt es sich bei dem ziemlich thermostabilen Aktivator, den FINE 212) im Serum gefunden hat (Mensch, Schaf, Rind, Ratte, *Cavia*). Wird bei 70° nicht vernichtet, geht nicht in Chloroform über; die Wirkung wechselt mit dem ph und wird durch höhere Serumkonzz. verringert.

Saccharase als Antigen. Es kann wohl als sicher angenommen werden, daß die Auslösung von Antikörpern nach Injektion von S. ausschließlich den kolloiden Begleitstoffen zukommt, nichts mit der Struktur des eigentlichen Enzyms zu tun hat. Dies wird neuerdings auch von BACH 213) angenommen, der fand, daß auch erhitztes Ferment derart als Antigen wirkt. MATSUOKA 214) gibt an, daß nach Injektion von S. in Kaninchen die Sera hemmen, namentlich wenn man dem Antigen, wie dies EULER vorgeschlagen hat, Schweineserum hinzufügt.

Specifische Hemmungen durch die Spaltprodukte und andere Zucker. Im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen liegen hier recht verwickelte Verhältnisse vor; oder vielleicht haben sie sich nur deswegen als so verwickelt herausgestellt, weil die Frage hier viel extensiver und intensiver untersucht worden ist. Da man nämlich — zunächst

---

210) ***G. Mezzadroli, A. Amati,*** Az. di alc. alcal. s. invert. Atti Acc. Lincei VI, **18**, 226 (1933). — 211) ***J. M. Nelson, E. L. Saul,*** Influ. of native proteins on the activ. of yeast invert. Jl. Amer. Chem. Soc., **56**, 1994 (1934). — 212) ***J. Fine,*** Invert.-accel. of serum etc. Biochem. Jl., **24**, 1282 (1930). — 213) ***A. Bach, W. Engelhard, A. Samysslow,*** Rolle der Begleitst. b.d. Immun. mit Invert. Bioch. Zs., **160**, 261. — 214) ***K. Matsuoka,*** Antigene Eigsch. der Hefesacch. Zs. phys. Chem., **193**, 167 (1930) und Jap. Jl. of Exp. Med., **8**, 615 (1930).

weitgehend mit Recht — die Hemmung durch die eigentlichen Spaltprodukte (α-Glucose und Fructose) und weiterhin durch verwandte Zucker als ein verwertbares und meßbares Zeichen bestehender Affinitäten zwischen dem Enzym Saccharase und den Zuckern ansah, so spielten die möglichst exakten Messungen dieser Hemmungen bei den Specifitätsfragen eine maßgebliche Rolle insbesondere, als RICH. KUHN die Existenz der beiden Typen von S. auffand, der Fructo- und Glucosaccharase, wobei er zum mindesten im Anfang die Hemmungserscheinungen in den Vordergrund rückte.

Wir konnten aber noch im H. W. S. 565 ff. darauf hinweisen, daß die Dinge sich nicht so widerspruchslos gliedern ließen, wie KUHN es zuerst annahm: daß nämlich α-Glucose nur die Glucosaccharase, Fructose (da die α-Form nicht rein bekannt ist, β oder α, β) nur die Fructosaccharase specifisch hemmt. Dort ist auch bereits berichtet, daß Fructose auch von β-Glucose und verschiedenen anderen Monosen gehemmt wird; bei α-Glucose zeigten sich die Befunde an verschiedenen Hefen bei KUHN und bei VON EULER verschieden. Es ergaben sich ferner starke Hemmungen durch beide Methylglucoside. Bei diesen letzteren ergab sich als Befund von großer Tragweite für die weitere Entwicklung, daß ihre Hemmung nicht auf einer specifischen Ablenkung des Enzyms durch Affinität beruht, **(kompetitive Hemmung)** sondern auf einer Verminderung der Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substratverbindung, wie sie L. MICHAELIS schon lange vorher für Glycerol festgestellt hatte („**nicht komtitive Hemmung**", Glycerintypus der Hemmung). (vgl. dazu JOSEPHSON **215**) und H. W. S. 190).

Denn nachdem sich eine kurze Zeit lang die Befunde immer widerspruchsvoller gestaltet hatten und auch KUHN selbst bei Hefensaccharase scheinbar regellos Hemmungen verschiedener Art fand, ergab sich schließlich nach KUHN und MÜNCH **216**) die Lösung, daß man aus der Hemmung durch α-Glucose nichts auf eine Affinität der S. zur Glucosidogruppe der Saccharose schliessen kann, und somit dieses Argument auch garnichts für das Vorhandensein einer Glucosaccharase aussagen kann; denn die Hemmung durch α-Glucose hat ebenfalls den „Glycerintypus"; sie hat mit einer specifischen Fermentablenkung ebensowenig zu tun, wie die Hemmung durch nicht verwandte Zucker (Galactose), die Methylglucoside u. a. Dadurch erklären sich nicht nur die wechselnden Hemmungserscheinungen an sich, sondern auch schwer zu deutende Abweichungen in der Kinetik etc. Mit diesem Befund lehnt KUHN die „**Zwei-Affinitäts-Theorie**" v. EULER's ab: jede der beiden S. hat nur zu einem der beiden Teile der Saccharose Affinität. Darauf kann hier natürlich nicht eingegangen werden (s. JOSEPHSON **217**). Ungefähr gleichzeitig wies NELSON **222**) darauf hin, daß die Hemmung durch α-Glucose sich ganz anders verhält als die durch Fructose. — Andererseits fand WEIDENHAGEN (l. c. 26) bei der Taka-saccharase, trotzdem er sie ebenfalls — wegen der Raffinose-spaltung — für eine Fructosacch. hält, eine Nicht-wirkung von Fructose, und eine echte Affinitätshemmung durch α-Glucose; er kann diesen Befund auch nicht befriedigend erklären (§ 299).

Die Prüfung der Hemmungen durch Fructose unterliegt ja noch einer ganz besonderen Schwierigkeit, die bei allen diesen Überlegungen nicht außer Acht gelassen werden darf. Man prüft ja eigentlich immer die Hemmung der Saccharase-wirkung mit einem ganz untauglichen

---

215) ***K. Josephson,*** Specif. der Sacch. etc. Zs. phys. Chem., **149**, 71 (1925). — 216) ***R. Kuhn, H. Münch,*** Gluco- und Fructosacch. Zs. phys. Chem., **150**, 220; **163**, 1 (1927). — 217) ***K. Josephson,*** Theorie der Spec. der F. Hb. der Bioch. Erg. W. Bd. I, S. 695. Jena 1933.

Objekt, nämlich mit Fructo-pyranose, während Saccharose ja Fructo-furanose enthält. Man kann daraus also eigentlich nur sehr indirekt Schlüsse auf die Affinität der am-Fructose zur S., also auf die Hemmung ziehen. Außerdem besteht keine grundsätzliche Sicherheit, daß man die Affinitäten zum eigentlichen Substrat und zu den Spaltprodukten so ohne weiteres gleichsetzen darf. Es sind also große prinzipielle Schwierigkeiten vorhanden, und so kamen COLIN c.s. 218) zu einem non liquet. Sie konnten aus ihren kinetischen Versuchen überhaupt keine spezifischen Affinitäten zur Saccharase, weder für Glucose noch für Fructose ableiten. Sie können also auch keine Erklärung für diese scheinbar spezifischen Hemmungen geben. Es ergibt sich also jedenfalls das Negative, daß man allein auf den Hemmungserscheinungen keine Spezifitäten bestimmter Typen von S. aufbauen kann. Wir wollen uns deshalb damit begnügen, noch einige Einzelheiten über diese an sich sehr interessanten Hemmungen hier anzugeben.

EULER u. JOSEPHSON 219) fanden Verschiebungen in der Affinität je nach dem ph: Fructose hemmt bei stark saurer Reaktion sehr wenig, die Hemmung steigt bis zum Neutralpunkt an, während Glucose beim opt. ph 4,46 am stärksten hemmt. Die Hemmung durch die Spaltprodukte gestaltet sich verschieden, wenn man sie gleichzeitig mit Hemmern des Glycerintypus wirken läßt, also je nachdem Alkohol oder Methylglucosid (JOSEPHSON, l. c. 215); JOSEPHSON gibt weiterhin an, daß Methylglucosid in verschiedener Weise hemmt, je nachdem man Saccharose oder Raffinose als Substrat benutzt. Dies wird im Sinne der „Zwei-affinitäts-theorie" gedeutet: ein zweiter Hemmungskörper einem ersten hinzugefügt, kann nur dann zu voller Wirkung kommen, wenn er mit einer anderen Teil-affinität gebunden wird (VON EULER 220)). KUHN u. MÜNCH 216) fanden bei S. aus 12 verschiedenen Hefen 4 verschiedene Hemmungstypen:

Zusatz	I	II	III	IV
α-Glucose	sehr schwach	—	+	+
β-Glucose	+	—	+	+
Fructose	+	+	—	+

Bei Typus III, bei dem Fructose garnicht hemmt, wird man an Glucosacch. zu denken haben. Es wird ferner festgestellt, daß zwar die Affinität zu einem Disaccharid immer auch die Affinität zu einem der Spaltprodukte nach sich zieht, aber nicht umgekehrt: die Affinität zu einer Monose braucht nicht die Bindung des Enzyms an die darauf aufgebauten Biosen zur Folge zu haben. So einfach, wie es sich HATTORI 221) gedacht hatte, ist es also sicherlich nicht, der aus seinen Befunden geschlossen hatte, daß bei Hefensacch. nur β-Glucose hemmt, α garnicht, bei Taka umgekehrt; bei S. der Hefen sollte es sich um nicht kompetitive, bei Taka um Affinitätshemmung handeln. Hierzu seien noch einige wichtige Arbeiten von NELSON 222—225) über Einzelprobleme erwähnt: Bei der S. des Honigs hat α-Glucose bei hoher Konz. einen hemmenden Einfluß, der bei niederer sogar in Aktivirung umschlagen kann; er ist aber in jeder Richtung immer geringer als der von β oder α, β-Glucose. Fructose hemmt fast gleichmäßig, aber schwächer (222). α-Methylglucosid hemmt an sich, gleicht aber die Hemmung durch Invertzucker ungefähr aus (223) (vgl. dazu den ähnlichen Befund von INGER-

218) ***H. Colin, A. Chaudun***, Act. inhib. de cert. prod. sur l'hydrol. diast. du saccharose. Jl. de Chim. Physique, 28, 546 (1931). — 219) ***H. v. Euler, K. Josephson***, Acid. Beding. der enzym. Rohrzuckersp. Zs. phys. Chem., **155**, 1 (1926). — 220) ***Dies.***, Hemm. Ersch. bei der enz. Rohrz.-Spalt. Zs. phys. Chem., **152**, 31 (1926). — 221) ***Y. Hattori***, Verh. von α- und β-Glucose zur Hefe- und Taka-Inv. Jl. of Biochem., **5**, 39 (1925). — 222) ***J. M. Nelson, C. Th. Sottery***, Infl. of gluc. and fruct. on the . . . hydrol. of sucr. Jl. of Biol. Chem., **62**, 139 (1924). — 223) ***Ders., B. Freeman***, Hydrol. of sucrose by invert. ebd. **63**, 365 (1925). — 224) ***Ders., R. S. Anderson***, Gluc. and fruct. retard. of inv. act. ebd. **69**, 443 (1926). — 225) ***Ders., C. J. Post***, Hydrol. of sucr. by inv. etc. ebd. **68**, 265 (1926).

SOLL, l. c. 204). In den ersten Stadien hemmt β-Glucose stärker als α, β-Fructose, diese mehr als β-Fructose. Die Abnahme der Hemmung bei sinkender Konz. an Saccharose ist ungefähr gleichlaufend. Dagegen hat die α-Glucose einen ganz anderen Typus der Hemmung, sie ist fast unabhängig von der Konz. an Saccharose, ist am stärksten bei 20 % Saccharose (**224**); auch hier also der Hinweis auf die andersartige Hemmung durch α-Glucose. Durch α-Methylglucosid wird die NELSON-HITCHCOCK'sche Gleichung derart verändert, daß die Konstante N stetig mit dem Verlauf der Hydrolyse anwächst. Bei geeigneter Mischung von Invertzucker + Methylglucosid (6 : 0,125 auf 10 %-igen Rohrzucker) bleibt N konstant, als ob garkein Hemmungskörper vorhanden wäre. Invertzucker hemmt am stärksten bei sehr geringer Konz. an Saccharose, Methylglucosid dagegen am stärksten bei hoher Konz. Bei allen diesen Vorgängen bleibt das ph-Optimum stets bei 4,5—4,7, und auch die Hemmungen selbst sind unabhängig vom ph (**225**).

II. α-Glucosidasen.

§ 321. Glucosidasen sind alle Fermente, welche die α- oder β-glucosidische Bindung in Holosiden und Heterosiden zerlegen. Ihre Affinität richtet sich ausschließlich gegen Gluco-pyranose, wie ja auch nur diese natürlich vorkommt (wenn wie wahrscheinlich auch das 6-Glucose-phosphat im ROBISON-Ester pyroid ist). Im Versuch fand HAWORTH **226**) das α-Methyl-gluco-furanosid gegen alle bekannten Enzyme resistent (Saccharase, Maltase, Emulsin). R. KUHN **227**) hatte dasselbe schon früher für das ungetrennte Gemisch beider Methyl-gluco-furanoside (Emil FISCHER's γ-Methylglucosid) gefunden, nur eine schwache Spaltung durch Schweineleber und Hefen-autolysat, die nicht weiter verfolgt wurde; wahrscheinlich enthielt das Präparat geringe Mengen der pyroiden Form.

Ist die Konfiguration an der Glucosidbindung α, so bezeichnen wir demgemäß die Enzyme als α-Glucosidasen; die übrigen sind die β-Glucosidasen, die wir §§ 333 ff. behandeln werden. Unter den α-Enzymen sind bisher nur solche bekannt, die man als eigentliche Holosidasen bezeichnen muß: denn natürliche α-Heteroside scheint es nicht zu geben; das eine Zeit lang als α-Heterosid angesehene Gaultherin, zu der dann eine spezifische Gaultherase als einzige bekannte α-Heterosidase gehören sollte, ist in Wirklichkeit ein β-Glucosid (§ 330)*). Die zahlreichen angegebenen Spaltungen synthetischer α-Heteroside werden also hier zweifellos von denselben Fermenten katalysirt wie die der Holoside.

Die Spezifitätsfragen sind auch hier noch unklar: es steht zur Diskussion, ob es nur eine oder mehrere α-Glucosidasen gibt. Wir haben dies §§ 299, 300 eingehend besprochen und wollen nun, ohne darauf nochmals einzugehen, bei der Beschreibung unterscheiden die Gluco-saccharase im Sinne R. KUHN's, die Maltasen mit ihren beiden Typen der Gluco- und Glucosido-maltase nach LEIBOWITZ, von denen nur die letztere auf synthetische Glucoside wirken soll, und die Trehalase, über deren Eigenexistenz und Spezifität noch nichts abschließendes gesagt werden kann.

1) Glucosaccharase.

Was die Gluco-saccharase für ein Ferment ist, und wo wir sie zu suchen haben, ist trotz allem aufgewendeten Scharfsinn doch noch nicht mit Sicherheit auszusagen

*) TAUBER u. KLEINER (**227a**)) haben angeblich in Knollen von *Solanum indicum* ein α-Glucosid gefunden, über das aber nähere Angaben nicht vorliegen.

226) ***W. N. Haworth, C. R. Porter, A. C. Waine,*** Cryst. α-Methylglucofuran. Jl. of Chem. Soc., **1932**, 2254. — 227) ***R. Kuhn, Th. Wagner-Jauregg,*** Einw. von Enz. auf γ-Methylgluc. Zs. phys. Chem., **162**, 103 (1926). — 227a) ***H. Tauber, I. S. Kleiner,*** Spec. of α-glucosidase. Jl. of biol. Chem. **105**, XCI (1934).

(§ 299). Auf der einen Seite steht die Ansicht WEIDENHAGEN's (§ 300), der sie glattauf mit der Maltase identifizirt, die überhaupt die einzige α-Glucosidase ist. Auf der anderen Seite hat SCHLUBACH 228) den bisher nicht widerlegten aber auch nicht näher bearbeiteten Befund erhoben, daß das Invertin aus *Aspergillus oryzae*, also das Prototyp der Gluco-saccharase, α-Methyl-fructo-furanosid spaltet; es spricht dies entweder für die Fructosidase-natur der Glucosacch. oder für eine sonst noch niemals beobachtete eigne α-h-Fructosidase.

Zwischen diesen beiden Polen, daß die Glucosacch. nichts anderes ist, als die einzig vorhandene α-Glucosidase, oder daß sie möglicherweise doch eine sonderbar veränderte Fructosidase ist, steht nun die Ansicht R. KUHN's, daß sie eine Glucosidase ist, aber ein eigenes Enzym im Rahmen der α-Glucosidasen. Sie ist also auch von der Maltase verschieden, wenn auch KUHN in seiner letzten diese Frage betreffenden Arbeit (l. c. 216) auf die diesbezügliche Behauptung WEIDENHAGEN's noch nicht eingehen konnte, da sie noch nicht veröffentlicht war. Dieses Enzym hat im Gegensatz zur Saccharase im strengen Sinne, der Fructo-saccharase, eine Affinität zur Glucose-gruppe der Saccharose, allein zu dieser oder im Sinne VON EULER's betont zu dieser. Faktisch definirt ist dieses Ferment ganz provisorisch dadurch, daß es Raffinose nicht angreift, ebensowenig Gentianose, wohl aber Melecitose; das letztere Argument ist nicht unbestritten (s. u.).

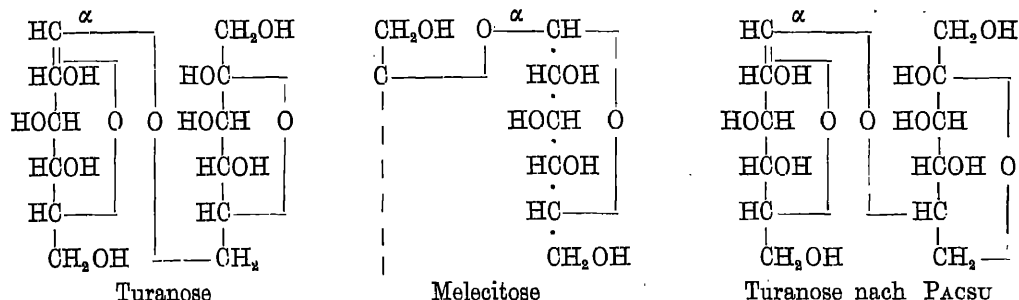
Wenn nun die ursprüngliche Annahme KUHN's sich hätte bestätigen lassen, daß beide Typen von Saccharase biologisch verschieden verteilt und dadurch leicht trennbar sind, so wäre ja alles sehr einfach; aber grade dies hat KUHN selbst nicht aufrecht erhalten. Zum mindesten bei niederen Organismen, bei echten Hefen selbst, bei Schimmelpilzen, bei Wirbellosen finden sich Wirkungen beider Typen, die äußerst schwer zu deuten sind. Entweder können sich beide Typen vertreten oder sie kommen in Mischungen vor, oder es sind Fermente mit unausgebildeter Spezifität, wie wir mehrfach ausgeführt haben (§§ 312, 314). Im letzteren Sinne wäre vielleicht auch die ganz isolirt dastehende Angabe von SCHLUBACH 228) zu deuten, daß *Asp. oryzae* eine sonderbare Fructosidase enthält (s. o.). Wir können also deskriptiv hier nur so vorgehen, daß wir als typisch für die Gluco-sacch. ihr betontes Vorkommen in *Asp. oryzae* und einigen anderen Schimmelpilzen, sowie in den Wirbeltieren annehmen. Eine exakte Klärung aller dieser Fragen steht noch aus, und eine positive Lösung ist wahrscheinlich nur dann zu erwarten, wenn eine präparative Trennung der beiden angenommenen Saccharasen erfolgen könnte.

Substrate der Glucosaccharase sind: in erster Linie Saccharose, deren Struktur § 308 besprochen ist, sowie **Melecitose**. Bei deren Zerlegung entsteht zunächst Glucose neben **Turanose**, einer Glucosido-fructose; aber Turanose scheint durch dieselbe α-Glucosidase (oder durch Maltase) meist glatt weiter in Glucose + Fructose zerlegt zu werden. Ob es eine eigene Turanase gibt, ist bisher nicht exakt untersucht worden. Jedenfalls sind beide, Melecitose wie Turanose, gegen die echte Fructo-sacch. aus Hefen resistent, werden aber von Enzymen aus Schimmelpilzen zerlegt (H. W. S. 544), Turanose aber auch von Unterhefen (BRIDEL 229)). Nach BRIDEL ist nun aber wieder bei *Asp. niger* das Enzym der Rohrzuckerspaltung von dem verschieden, das Melecitose angreift, da die Wirkung bei verschiedenen Kulturen verschieden verteilt ist.

---

228) ***H. H. Schlubach, G. Rauchalles,*** Spalt des γ-Methylfructosids etc. Ber. Chem. Ges., **58**, 1842 (1926). S.A. — 229) ***M. Bridel, Th. Aagard,*** Hydrol. diast. du turanose (méléc.). C. R., **184**, 1667; **185**, 147; Bull. Soc. Chim. Biol., **9**, 884 (1927).

Melecitose hat ihren Namen von *Mélèze*, wie in Frankreich die Lärche *Larix Europaea* genannt wird, auf deren Zweigen als Ausschwitzung, *Briançon-Manna*, die M. gefunden wurde; sie kommt auch in anderen Manna-Arten vor. Ihre zusammensetzung im Groben wurde von BERTHELOT 1856 festgestellt. Genauere Festlegung der Struktur als Glucosido-fructosido-glucosid durch KUHN **230)**, ZEMPLÉN **231)** und LEITCH **232)**. Das erste Spaltprodukt neben Glucose ist Turanose, eine α-Glucosido-fructose, deren α-Bindung von BRIDEL **229)** erwiesen wurde. Turanose wurde dann von HUDSON u. PACSU **233)**, rein und kristallisirt erhalten. Da die Turanose eine α-Glucosido-6 fructose ist, so würde unter der Annahme, daß die Fructose dieselbe Struktur hat wie im Rohrzucker, daß also Melecitose eine Glucosido-Saccharose ist, deren Struktur wie folgt sein:

Turanose Melecitose Turanose nach PACSU

Gegen die Struktur als Glucosido-saccharose sprach nun aber die Tatsache, daß Turanose von Fructosidasen nicht angegriffen wird. War die Struktur richtig, so mußte man annehmen, daß die Fructosaccharase nicht nur auf die Fructofuranose als solche, sondern ganz isolirt auf die β-Bindung in C_2 der Fructofuranose eingestellt ist. Das wäre ja an sich durchaus möglich und ist nicht zu entscheiden, ehe nicht andere zweifellose Fructoside mit am-Fructose dargestellt und geprüft sind. Aber die Struktur der Turanose steht noch nicht fest. PACSU **234)** hält vielmehr die Turanose für einen Abkömmling der Fructopyranose <2,6>, so daß er die Glucosidbindung nach 5 verlegt, mit der Wahrscheinlichkeit, daß in Lösung eine Ringverschiebung nach <2,4> von sich geht. In diesem Falle wäre jegliche Beziehung zwischen Turanose und damit Melecitose und der Fructosidase abzulehnen, und die totale Spaltung der Melecitose das Werk einer α-Glucosidase. Dem entspricht, daß WEIDENHAGEN eine totale Zerlegung von Melecitose in Glucose und Fructose durch ein Enzym der Unterhefen angegeben und BRIDEL **229)** dies bestätigt hat. Ob dies nun „Maltase" oder „Glucosaccharase" ist, das eben ist die bisher ungeklärte Frage.

Glucosaccharase der Kryptogamen. Die ursprüngliche Annahme von KUHN, daß die Takasaccharase von *Aspergillus Oryzae* nur Glucosacch. ist, hat er selbst aufgegeben, Taka kann auch Fructosidase enthalten, ebenso das zweite Hauptobjekt, *Penicillium glaucum* (vgl. § 299). Und andererseits findet sich Glucosacch. in anderen Aspergilleen, und sogar auch in echten Hefen, wie die Spaltung von Melecitose durch Unterhefen (s. o.) gezeigt hat. Taka spaltet auch Saccharose-PhS; jedoch ist dies nicht unbedingt auf eine Fructosidase zu beziehen, da vielleicht das Präparat auch fructosidisch gebundene PhS enthalten hat (OHMIYA **235)**).

230) ***R. Kuhn, G. E. v. Grundherr,*** Konst. der Melec., Ber. Chem. Ges., **59,** 1655 (1926). S.A. — 231) ***G. Zemplén, G. Braun,*** Konst. der Turanose. ebd. **59,** 2230, 2539 (1926). S.A. — 232) ***G. C. Leitch,*** Melecit. and turan. Jl. of Chem. Soc., **1927,** 588. — 233) ***C. S. Hudson, E. Pacsu,*** Rel. betw. rotat. power etc. (Turanose) Jl. Amer. Chem. Soc., **52,** 2519 (1930). — 234) ***E. Pacsu,*** Const. of melec. and turan. Jl. Amer. Chem. Soc., **53,** 3099 (1931). — 235) ***S. Ohmiya,*** Hydrol. der Hexosid-PhS. Jl. of Biochem., **18,** 125 (1933). S.A.

Es wäre also wirklich am einfachsten, nach WEIDENHAGEN diese Glucosacch. mit der Maltase gleichzusetzen, und zwar mit der „Glucosidomaltase" der Hefen, wenn eben nicht soviele übereinstimmende Angaben vorlägen, daß Maltase von Kryptogamen, die keine Glucosacch. enthalten, wie einige Bakterien, zwar Maltose angreift, aber nicht Saccharose (§§ 300, 327). Auch die Angabe von HATTORI **236**), daß Taka α-Methylglucosid nicht angreift, auch nicht von ihm gehemmt wird, scheint nicht widerlegt, freilich auch nicht bestätigt; auch dies wäre ein Gegenbeweis gegen die Identität mit Maltase. Es ist bisher unmöglich, Klarheit in diese Verhältnisse zu bringen.

Da Glucosacch. einen opt. ph von ca 7 hat, Fructos. von 4,7, so müssten Mischenzyme unscharfe Optima dazwischen aufweisen, und dies ist in der Tat bei *Aspergillus flavus* u. a. gefunden worden, wie § 312 berichtet. Aber auch die in den Zellen festhaftende S. von *Schizosaccharomyces octosporus* hat nach HOFMANN ein abnormes ph-Optimum von 5,6 (s. d. Tabelle § 320).

Eine oberflächliche Reinigung der Takasaccharase hat TAKETOMI **237**) durchgeführt, indem er durch Bleiacetat (1,2 %) einen erheblichen Teil des Ballastes entfernen konnte. Andere Fraktionirungen haben wenig Erfolg.

§ 322. **Tierische Saccharase.** Hier verstehen wir unter tierische S. nur die der Wirbeltiere, da die der Wirbellosen als vermutliche echte Fructosacch. § 314 abgehandelt ist. Diese Trennung geht wahrscheinlich der wirklichen Entwicklung der Dinge voraus insofern, als die Sacch. der Wirbeltiere wohl tatsächlich eine Glucosaccharase sein wird. Aber die Dinge sind auch hier noch sehr unklar. Feststehend sind eigentlich nur zwei Tatsachen als Grundlage exakterer Erforschung: erstens daß bei höheren Tieren Spaltung von Saccharose nur im Darm erfolgt, daß also Saccharase bei diesen kein Stoffwechselferment der Organzellen ist. Saccharose ist ja auch tatsächlich kein Nährstoff und wird bei parenteraler Injektion sozusagen als Fremdkörper wieder mit dem Harn ausgeschieden.

Ferner wird noch Saccharase in den Leukocyten angegeben; eine volle Klärung liegt nicht vor, vielleicht hat grade in diesem Falle WEIDENHAGEN recht und man hat bisher immer die Rohrzuckerspaltung durch Maltase in den Leukocyten gemessen .Wenn man gelegentlich einmal S. im Blute findet, so ist sie einfach mit den Nahrungsmitteln aufgenommen und dann natürlich echte Fructosidase (WEIDENHAGEN l. c. 148). Die durch „Immunisirung" im Harn auftretende S. (s. u.). ist ihrer Natur nach noch nicht näher bekannt, wahrscheinlich stammt sie aus zerfallenen Leukocyten.

Die andere längst bekannte Tatsache ist die, daß sich die S. der Wirbeltiere in bezug auf ihre äußeren Eigenschaften wesentlich von der echten S. unterscheidet, z. B. im opt. ph (H. W. S. 570).

Da nun S. in keinem tierischen Gewebe vorkommt, Maltase andererseits ein Ferment aller Zellen ist, so ist es vorläufig schwer einzusehen, wie WEIDENHAGEN seine These aufrecht erhalten will, daß Spaltung von Rohrzucker durch Angriff auf die Glucosegruppe einfach der Maltase als der einzigen α-Glucosidase überhaupt zugeschrieben werden soll. Diese Frage, auf die wir § 300 eingegangen sind, ist bisher ebenso wenig zu lösen wie die nach der besonderen Art der S. der Wirbeltiere überhaupt, da exakte Untersuchungen mit modernen Mitteln durchaus fehlen. Es sind noch nicht einmal die Vorfragen klargestellt, ob diese S. des Wirbeltierdarmes Raffinose oder Melecitose angreift. Raffinose-spaltung fehlt meist, wird aber auch gelegentlich beobachtet (WEIDEN-

---

236) ***Y. Hattori,*** Verh. von α- und β-Methylgluc. zur Takainvert. Bioch. Zs., **150,** 150 (1924). — 237) ***N. Taketomi,*** Saccharase. Jl. Soc. Chem. Ind. Japan, Suppl., **37,** 361 (1934); Chem. Cbl., **1935.** I, 582.

HÄGEN 238)); über die Spaltung von Melecitose habe ich keine Angaben finden können. Sie ist aber auch bei Wirbellosen noch nicht klargestellt, z. B. ist bei Bienen nur die Verwertbarkeit überhaupt angegeben worden (§ 314). Es ist also immerhin möglich, daß kein essentieller Unterschied zwischen den Saccharasen beider Tierstämme bestehen, daß vielleicht beide Arten von S. nicht voll differenzirt sind und eine verschwommene Spezifität aufweisen. Die Zuordnung der S. der Wirbeltiere zu der Glucosacch. ist also ebenso provisorisch wie der der Wirbellosen zu der Fructosacch.

So seien hier nur die wenigen Angaben über dies auffallend vernachlässigte Ferment der höheren Tiere zusammengestellt.

Zur Frage des Vorkommens sei eine ältere im H. W. übersehene Arbeit von MORRIS c.s. **239)** nachgetragen, die im Gegensatz zu den (späteren) Angaben von BOISSEVAIN (*l. c. 273*) in Leukocyten keine Spaltung von Rohrzucker gefunden haben, vielmehr nur Maltase.

Im Darm des Fetus tritt bereits S. auf **(240, 241)**. Bei Hunden soll die S. des Darmes vermehrt sein nach Injektion von Histamin (KOSKOWSKI **242)**), vermindert nach Entfernung der Parathyreoidea (SUNZERI **243)**).

Bei mit NaF vergifteten Tieren (*Cavia*) fand COSTANTINO **243a)** die S. um fast 50 % vermindert.

Bei Mensch und *Cavia* fand entgegen allen anderen bisherigen Befunden S. in Organen NINNI **244)**. Auch hier dürfte es sich wohl um Verwechslung mit der S. der Leukocyten handeln, wie bei früheren derartigen Angaben, z. B. *l. c. 274*.

Bei Hühnern fanden S. BERNARDI c.s. **245)**, und zwar im Kaumagen und im Kropf. Es ist jedoch durchaus möglich, daß es sich hier wieder um Enzyme aus der Nahrung handelt. Allerdings gibt BERNARDI **246)** neuerdings an, daß S. sich in allen Geweben des Magens, sowie im Muskel der Hühner vorfindet. Dann hätten also die Vögel eine andere biologische Einstellung zur Produktion von S., diese Befunde bedürfen dringend der Nachprüfung. Im Sarkom der Hühner fand S. NAKAHARA **247)**.

Bei Schildkröten (*Testudo*) fand WOLVEKAMP **248)** S. im Darm, nicht im Pankreas. Bei Fischen (*Cyprinus*) fehlt sie anscheinend ganz (VONK, l. c. 305).

Saccharase nach Rohrzuckerinjektionen. Die alte Frage, ob nach Einspritzung von Saccharose als Reizbeantwortung S. auftritt, gleichgiltig zunächst, ob sie etwa neu gebildet wird oder aus Leukocyten mobilisirt, hat insofern eine endgiltige Beantwortung gefunden, als in diesem Falle von ABDERHALDEN **249)** mit feinster Methodik S. im Harn gefunden worden ist, und zwar schneller, wenn man die Injektionen wiederholt.

---

238) ***R. Weidenhagen,*** Spec. u. Wirk. Mech. der zuckerspalt. Enz. Zs. V. D. Zuck., **79,** 115 (137) (1929). S.A. — 239) ***R. S. Morris, T. R. Boggs,*** (Saccharase in Leukocyten) Arch. of int. Med., **8,** 806 (816) (1911). — 240) ***M. F. L. Keene, E. E. Hewer,*** Maltase im menschl. Fötus. Lancet, **216,** 767; Chem. Cbl., **1929,** I, 3109. — 241) ***T. Tachibana,*** Phys. Inv. of fetus VII. Jap. Jl. Obst., **12,** 21 (1929); BPh **53,** 115. — 242) ***W. Koskowski,*** Infl. of histamine on the intest. secr. etc. Jl. of Pharm., **26,** 413 (1926). — 243) ***G. Sunzeri,*** Attiv. d. enz. enter. dei cani sparatir. Arch. di Fis., **23,** 509 (1926); BPh **37,** 198. — 243a) ***A. Costantino,*** Comport. di alc. ferm. .... nell' intoss. ... da NaF. Boll. Soc. ital. Biol. **9,** 916 (1934); BPh **85,** 165. — 244) ***C. Ninni,*** Pres. di ... invert. negli organi etc. Pathol., **17,** 73 (1925); BPh **34,** 256. — 245) ***A. Bernardi c.s.,*** Ferm. invert. etc. Bioch. Ter. Sper. **10,** 290; **11,** 227 (1924). — 246) ***A. Bernardi, M. A. Schwarz,*** Invert. im Kaumagen der Hühner. Bioch. Zs., **256,** 406 (1932). — 247) ***W. Nakahara, M. Sumi,*** The alleged enzyme-like nat. of the so called caus. ag. of chicken sarcoma. Proc. Imp. Acad. Tokyo, **3,** 376 (1927). — 248) ***H. P. Wolvekamp jr.,*** Kohlenhydratverd. im Darm der Schildkröte. Zs. vergl. Phys., **7,** 454 (1928). S.A. — 249) ***E. Abderhalden, S. Buadze,*** Saccharase im Blutserum bezw. Harn nach parent. Zufuhr von Rohrz. Fermentforsch., **13,** 228 (1932).

Danach muß S. auch die Blutbahn passiren, aber hier ist der Nachweis bisher nicht gelungen, auch ABDERHALDEN nicht, wie ebenso ODA **250)**, BERG **251)** und FINE (l. c. 212).

2) Maltase.

§ **323.** Eine endgiltige Entscheidung, was „Maltase" ist, ist noch nicht zu geben. Es steht noch die Beantwortung der Frage aus, ob es überhaupt nur eine α-Glucosidase gibt, wie WEIDENHAGEN will, oder mehrere; und wenn man dies annimmt, wie viele. Lassen wir selbst nun die genügend ventilirte Frage, ob Maltase auch Rohrzucker spaltet, also identisch mit der „Glucosaccharase" ist, bei Seite, bis wir im Einzelnen auf das Für und Wider nochmals zurückkommen, so steht noch die zweite Frage aus, wie die seit langem bekannte Differenz verschiedener Maltasen gegenüber einerseits den synthetischen α-Glucosiden, andererseits gewissen Derivaten der Maltose mit Veränderung der freien Glucosegruppe zu deuten ist.

Betreffend die α-Glucosidspaltung haben die Ansichten bekanntlich wiederholt gewechselt zwischen der Annahme einer besonderen α-Glucosidase, die den Maltasepräparaten mehr oder minder wirksam beigemengt ist, und der Annahme verschiedener Maltase-Typen mit mehr oder minder ausgedehnter relativer Spezifität. Letztere Ansicht wurde dann im Prinzip durch WILLSTÄTTER c.s. **252)** zum Siege geführt, indem sie zeigten, daß auch bei Hefen, also den Glucoside angreifenden Maltasen, die Verhältniszahl von Maltosespaltung zu Glucosidspaltung erheblich schwanken kann: Methylglucosid/Maltose von 0,2 bei einer Bierhefe bis 1,4 bei einer Preßhefe. Es steht also an sich nichts im Wege, weitergehende Verschiebungen anzunehmen, bis man zu solchen Verhältniszahlen gelangt, daß die Glucosidspaltung unter die Schwelle der Nachweisbarkeit sinkt, wie dies bei der tierischen Maltase u. a. der Fall ist. Man braucht sich dabei auch nicht auf die Methylglucoside zu beschränken, da andere, besonders die α-Phenolglucoside häufig noch dann nachweislich spaltbar sind, wenn die Methylglucoside versagen. An sich könnte man also damit auskommen, daß es eine ganze Schar von Maltasen gibt, die alle dasselbe Enzym sind, aber über weite Strecken hin verschiedene relative Spezifitäten aufweisen, etwa von den besonders stark auf Glucoside wirkenden Preßhefen bis zu den nicht mehr nachweisbar wirksamen tierischen Maltasen. Da man wie stets diese wechselnden Affinitäten auf Wandlungen nicht der Wirkgruppe, sondern des Trägers bezieht, so ist es auch durchaus wahrscheinlich, daß eine nicht unerhebliche Variabilität in dieser Hinsicht vorkommt, besonders bei den Kryptogamen, und hier wieder den Bakterien, so daß auch hier wieder — genau wie bei den verschiedenen Saccharasen — differente Einzelbefunde durchaus nicht auf Versuchsfehlern beruhen müssen. Wichtig dafür ist, daß eine nur auf α-Heteroglucoside wirksame α-Glucosidase nicht existiert; ein alter diesbegl. Befund bei Weinhefen von KALANTHAR (*l. c. 122*) ist von PRINGSHEIM und LOEW (l. c. 274) als irrtümlich erwiesen worden: die Maltosespaltung steht immer im Mittelpunkt.

Es ist nun aber eine neuartige Erklärung dieser Differenzen gegeben worden, die doch wieder auf zwei Enzyme zurückgreift, aber in ganz anderer Weise als die älteren Anschauungen, z. B. von BIERRY. Es soll nämlich nach LEIBOWITZ **253)** nicht zwei

---

250) ***T. Oda,*** Parent. Zufuhr von Rohrz. und Invert. Jl. of Biochem., **9,** 383 (1928). — 251) ***G. Berg,*** Tritt nach parent. Rohrz. Sacch. im Blut auf? Arch. exp. Path., **168,** 713 (1932). — 252) ***R. Willstätter, R. Kuhn, H. Sobotka,*** Relat. Spez. der Hefenmalt. Zs. phys. Chem., **134,** 224 (1924). — 253) ***J. Leibowitz,*** Gerstenmalz-Maltase, Zs. phys. Chem., **149,** 184 (1925); **154,** 64 (1926). —

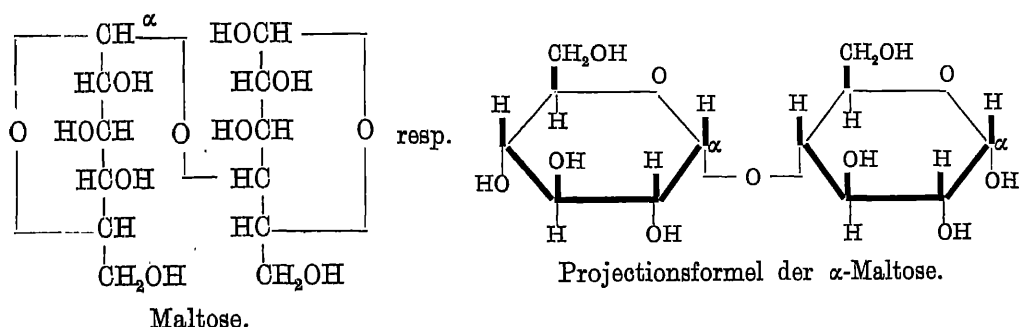
ganz verschieden wirksame und in ganz verschiedenen Mischungen vorkommende Enzyme geben, von denen eins auf Maltose, ein anderes auf synthetische Glucoside wirkt, sondern zwei Maltasen, die also beide als Hauptsubstrat Maltose angreifen, aber in verschiedener Weise, und die biologisch verschieden verteilt sind, also wie die beiden Saccharasen, wobei wieder noch die Komplikation zu berücksichtigen ist, daß auch u. U. beide gemischt und verschieden gemischt vorkommen können. Die Verschiedenheit der Wirkung erklärt LEIBOWITZ ebenso wie beim Rohrzucker: die eine Maltase soll nur die α-Glucosido-gruppe angreifen, eine **Glucosido-maltase** sein, die andere nur die freie Glucosegruppe, eine **Gluco-maltase** sein. Die Theorie hat Zustimmung und Ablehnung erfahren, wir kommen auf die Einzelheiten noch zurück. Ist sie richtig, so gibt es zwei Maltasen für dasselbe Substrat, wie es zwei Amylasen und verschiedene Phosphatasen gibt. Anderweitig zureichend definirt, etwa durch äußere Momente, sind sie bisher noch nicht; es ist daher vorläufig noch untunlich, sie beschreibend zu trennen. Wir behandeln wie üblich das Kap. Maltase noch zusammen, und diskutiren in diesem Rahmen das noch umstrittene Problem der beiden Typen.

a) Wirkungen.

§ 324. (*H. W.* § *326*). Das eigentliche Substrat der Maltase ist das Disaccharid **Maltose.** Die Struktur der Maltose steht nunmehr endgiltig fest. HAWORTH **254)** hat sie erkannt als eine α-Glucosido-4-Glucose, beide Glucosen sind normale Pyranosen.

```
 ----- CHα ---- HOCH ------
|       |     |     |      |
|     HCOH    |   HCOH     |
|       |     |     |      |
O     HOCH    O   HOCH     O   resp.
|       |     |     |      |
|     HCOH    L--  HC      |
|       |           |      |
 ------ CH         HC------
        |           |
      CH2OH       CH2OH
```

Maltose.

Projectionsformel der α-Maltose.

Synthese von PICTET **255)** aus Glucosan + Laevo-glucosan neben einer β-2-Glucosido-glucose, die durch Emulsin spaltbar ist; besser durch direkte Kondensation von α-Glucose + β-Glucose im Vakuum bei 160°. Dabei entsteht zuerst α-Glucosan —CH—CH> O, das sich dann mit β-Glucose zu β-Maltose kuppelt **(256)**. Von weiteren biologischen Substraten kommt zunächst die **Turanose** in Frage (§ 321), jedoch ist auch dies nicht klargestellt. Zwar ist die frühere Ansicht, daß Turanose nur durch ein besonderes Enzym der Schimmelpilze zerlegt wird, unrichtig: BRIDEL u. AAGARD (l. c. 229) haben gezeigt, daß zwar β-Glucosidasen Turanose nicht angreifen, ebenso nicht Oberhefen, daß aber Unterhefen sie vollständig aufspalten. Damit ist aber auch bisher nur festgestellt, daß „Turanase" ein α-Ferment ist, aber ob sie mit der Maltase oder

254) ***W. N. Haworth, St. Peat,*** Const. of disacch. XI. Maltose. Jl. of Chem. Soc., **1926,** 3094. — 255) ***A. Pictet,*** Synth. du maltose, C. R. Soc. Phys. Genève, **40,** 133 (1923). — 256) ***A. Pictet, H. Vogel,*** Synth. du maltose, C. R., **184,** 1512 (1927).

Glucosaccharase identisch oder ein eigenes Enzym ist, bleibt offen. Die Nichtangreifbarkeit durch Oberhefen ist jedenfalls sehr sonderbar, denn diese enthalten ja die übliche Maltase stets, so daß es schwer ankommt, nun die fragliche Turanase wieder ohne weiteres mit der einzig vorhandenen α-Glucosidase gleichzusetzen, wie dies WEIDENHAGEN tun möchte (§ 300).

Der Hauptstreitpunkt, ob nun **Saccharose ein natürliches Substrat** der Maltase ist, führt uns wiederum in die so oft besprochenen Wirrnisse der Existenz oder Nicht-Existenz der Gluco-saccharase zurück. Hier handelt es sich speziell um die Behauptung WEIDENHAGEN's, daß diese Glucosacch. nichts anderes ist als eben Maltase, die bei ihrem opt. ph von 6—7 Saccharose an der Glucosido-gruppe angreift. Wir haben § 300 Gründe und Gegengründe eingehend behandelt und haben hier somit nur einige Einzelheiten der tatsächlichen Entwicklung der Diskussion nachzutragen.

Eines der Hauptargumente WEIDENHAGEN's war sein Befund (257), daß man nach der Methode WILLSTÄTTER-BAMANN (§ 325), die von WEIDENHAGEN etwas modifizirt wurde, Maltase und Saccharase aus der Hefe getrennt von einander erhalten kann, und daß dann diese beiden Enzyme nach seiner Auffassung eben tatsächlich Fructosidase und α-Glucosidase sind. Denn die so gereinigte von Saccharase freie Maltase spaltet Raffinose nicht, wohl aber Rohrzucker und Melecitose neben natürlich Maltose, und zwar beim opt. ph der Maltase, 6—7, während sie bei ph = 4,7, dem ph-Opt. der Fructo-saccharase, nicht mehr auf Rohrzucker wirkt, also keine Fructosidase enthält. Das klingt ungemein einleuchtend, und es wäre zweifellos die einfachste Lösung, wenn man diese These WEIDENHAGEN's annehmen könnte. Aber es sprechen eben doch Tatsachen der biologischen Verteilung der Enzyme dagegen, die zeigen, daß es Organismen gibt, deren Fermente zwar Maltose angreifen, Saccharose aber nicht. Dafür sprechen schon ältere Befunde: schon EMIL FISCHER (*l. c. 360*) hat gefunden, daß *Schizosaccharomyces octosporus* zwar Maltose, aber nicht Rohrzucker angreifen kann, und vor allem war die Tatsache bekannt, daß alle Organe höherer Tiere zwar Maltase enthalten, aber keine Saccharase (§ 322).

WEIDENHAGEN hat sich natürlich bemüht, diese starken Argumente gegen seine Vereinheitlichung zu entkräften, es sind dann aber im Laufe der Polemiken noch weitere derartige Tatsachen ans Licht gebracht worden, welche es schwer machen, die Gleichsetzung von Gluco-saccharase und Maltase zu acceptiren.

So hat HOFMANN **258)** den Befund EMIL FISCHER's bestätigt: die frische Hefe und der Autolysesaft von *Schizosacch. octosporus* greifen nur Maltose an, Saccharose nicht, bei keinem ph. Sie enthalten also weder Fructosidase, noch jene Glucosidase, welche Rohrzucker angreifen kann, die Glucosaccharase. Prüft man aber den Autolyserückstand, so enthält dieser ein Enzym, das Saccharose zerlegt, aber wieder, nach dem abnormen ph geschätzt, keine Fructosacch. ist, sondern eher Glucosacch. (§ 320). Ebenso verhalten sich *Schizosacch. Pombe* und *mellacei.*

Ganz analoge Fälle lassen sich bei Bakterien feststellen. Auch hier lag schon die Angabe von NEILL **258a)** vor, daß Meningokokken nur Maltose, keine Saccharose spalten. Im Verlauf der Polemik gegen WEIDENHAGEN haben sich weitere Fälle dieser Art gefunden. Zuerst fand KARSTRÖM **259)** (bei VIRTANEN) einen Stamm von *Bact. coli*, der nur Maltase enthielt, er griff zwar Maltose, aber weder Saccharose noch Melecitose an. WEIDENHAGEN **260)** hat bei demselben

257) ***R. Weidenhagen,*** Trenng. von α-Glucosidase und β-h-Fructos. Zs. V. D. Zuck., **80,** 155 (1930); **82,** 503 (1932). — 258) ***E. Hofmann,*** Maltase und Sacch. bei Schizosacch. octosp. Bioch. Zs., **272,** 417 (1934); **275,** 320 (1935). S.A. — 258a) ***J. M. Neill, E. L. Gaspari,*** Meningoc. maltase. Jl. of Exp. Med., **45,** 151 (1927). — 259) ***H. Karström,*** Spec. der α-Glykosidasen. Bioch. Zs., **231,** 399 (1931). — 260) ***R. Weidenhagen,*** Spec. der α-Glucosidasen. ebd. **233,** 318 (1931).

Stamm eine geringfügige Rohrzuckerspaltung gefunden, VIRTANEN **261)** hat sie wieder vermißt und den positiven Befund WEIDENHAGEN's auf Fremdinfektion bezogen, desgl. MYRBÄCK **262)**. Eine weitere Polemik zwischen WEIDENHAGEN **263)** und MYRBÄCK **264)** konnte diese Tatsache, daß es zum mindesten bei Bakterien eine ganz singuläre Maltose-spaltung ohne jeglichen Angriff auf Rohrzucker gibt, nicht aus der Welt schaffen, um so weniger, als sie erneut von TAUBER u. KLEINER **266)** an *B. coli communis* (*Escherichia coli*) bestätigt wurde. Ebenso fand HOTCHKISS **266a)** in 7 Präparaten aus *Escherichia coli*, daß nur Maltase vorhanden war, während verschiedene Enzym-präparate aus *Escherichia communior* in etwa gleicher Anzahl nur Maltase oder nur Saccharase oder beide Enzyme enthielten. TAUBER c.s. **267)** bestätigten endlich auch nochmals, daß tierische Maltasen (Speichel, Brustdrüse) ohne jede Wirkung auf Rohrzucker sind, was eben zu der alten Erkenntnis stimmt, daß Saccharase in tierischen Geweben nicht vorkommt.

Günstiger ist die Position WEIDENHAGEN's, in seiner Einheitstheorie auch die Identität von „Glucosidase" und „Maltase" wiederherzustellen im Sinne von EMIL FISCHER und WILLSTÄTTER, also im Gegensatz zu dem Versuch von LEIBOWITZ **268)**, zwei völlig getrennte Typen von Maltase aufzustellen, die **Glucosido-maltase** und die **Gluco-maltase.** Von diesen soll die erstere gerichtet sein auf die Glucosido-bindung in der Maltose, die andere auf die freie Glucose. Die erste ist somit unabhängig von Veränderungen an der freien Glucose, sie spaltet demgemäß auch die α-Alkyl-glucoside, ferner Maltosazon, Maltoson, auch β-Methyl-maltosid in Glucose + β-Methyl-glucosid (während Emulsin in Maltose + Methanol zerlegt) (H. W. S. 571, *l. c. 309—310a*, sowie HELFERICH **269)**). Die Gluco-maltase ist dagegen abhängig von diesen Abänderungen an der freien Glucose, sie kann deshalb die α-Alkyl-glucoside und die anderen genannten Derivate nicht angreifen. Umgekehrt soll eine Veränderung im Glucosido-teil die Wirksamkeit der Glucosido-maltase aufheben: Hefenmaltase zerlegt α-Methyl-gentiobiosid nicht in Gentiobiose + Methanol (HELFERICH, § 299).

Soweit die Angaben von LEIBOWITZ. Es ist aber bisher das Material nicht ausreichend, um seine weitgehenden Folgerungen betr. die Existenz zweier getrennter Typen von Maltase als notwendig erscheinen zu lassen. Ein Teil der Befunde, auf die er sich stützte, hat sich als unrichtig herausgestellt, soweit es sich um die angebliche Nicht-spaltbarkeit einiger Derivate der Maltose handelt. Vor allem aber hat sich herausgestellt, daß man bei den synthetischen Glucosiden nicht so ohne weiteres von einer Spaltung oder Nicht-spaltung durch die eine oder andere Maltase sprechen kann. Es ließ sich zwar die altbekannte Nicht-spaltung von Methyl-glucosiden durch die „Gluco-maltasen" nicht anfechten, wohl aber zeigte sich, daß auch ganz typische Gluco-maltasen (Taka, Malz) die Phenol-glucoside und verwandte aromatische Glucoside spalten, womit die bereits von WILLSTÄTTER (l. c. 252) festgestellte ganz allgemeine leichtere Spaltbarkeit der aromatischen Glucoside einen für die Differenzirung wichtigen Sinn erhielt. Denn es ist nun unmöglich, eine Maltase deswegen von der anderen qualitativ zu trennen, wenn sie zwar die Methyl-glucoside nicht, wohl aber die des Phenols etc. spaltet. Hier liegen

---

261) ***A. I. Virtanen,*** Spez. der α-Glucosidasen. ebd. **285,** 490 (1931). — 262) ***K. Myrbäck,*** Disacch.-Spalt. durch α-Glucosidase. Zs. phys. Chem., **198,** 196 (1931). — 263) ***R. Weidenhagen,*** Disacch. Spalt. durch α-Glucosidase. ebd. **200,** 279 (1931). — 264) ***K. Myrbäck,*** α-Glucosidase, etc. ebd. **205,** 248 (1932). — 266) ***H. Tauber, I. S. Kleiner,*** The ... spec. of malt. Jl. of gen. Phys., **16,** 767 (1933). — 266a) ***M. Hotchkiss,*** Spec. der Hexosidasen. Jl. of Bact. **29,** 391 (1935). Ch. Cbl. **1935,** II, 1565. — 267) ***I. S. Kleiner, H. Tauber,*** Pres. of glucomalt. in the mamm. gland. Jl. of Biol. Chem., **99,** 241 (1932). — 268) ***J. Leibowitz,*** Gerstenmalzmaltase etc. Zs. phys. Chem., **149,** 184 (1925). — 269) ***B. Helferich, J. Becker,*** Synth. eines Disacch.-Glucosids. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **440,** 1 (1924).

zweifellos nur wertmäßige Unterschiede in der Affinität vor, und so wird man auch in den anderen Fällen damit auskommen, nur eine Maltase anzunehmen mit den Eigenschaften einer breiteren Variabilität der relativen Affinität für verschieden gebaute Substrate. Es ist also ebensowenig gesichert, wenn TAUBER u. KLEINER **269a)**, in dem sie die Zweiteilung acceptiren, die Glucosido-maltase mit ihrer umfassenderen Wirkung einfach α-Glucosidase nennen, das auf Maltase selbst beschränkte (freilich α-Phenolglucosid langsam angreifende) Ferment von *Solanum indicum* nun als Pseudo-α-glucosidase bezeichnen wollen. Jedenfalls reicht das bisherige Material zum Beweis einer Existenz zweier ganz verschiedener Maltasen nicht aus. Im Einzelnen hat sich diese interessante Frage wie folgt entwickelt:

LEIBOWITZ **268)** fand bei der näheren Untersuchung der wenig bekannten Maltase des Gerstenmalzes, daß sie von der der Hefe verschieden ist in bezug auf die Stabilität, die ph-Aktiv.-Kurve (Opt. ph = ca 4,5) etc. Weiter zeigte sich, daß diese M. Methylglucosid weder spaltet noch synthetisch bildet, auch β-Methylmaltosid nicht angreift. Sobald also eine Änderung an der freien Glucosegruppe erfolgt, hat dieses Enzym keine Wirkung mehr, während dies die M. der Hefen nicht berührt (s. o.). Andererseits spaltet die M. der Hefen nicht das α-Methyl-gentiobiosid, weil der Eintritt der neuen Glucose-gruppe in die erste Glucosidogruppe diese so verändert, daß sie nun für das Enzym unangreifbar wird.

Aus diesen Beobachtungen gelangte LEIBOWITZ zu der Aufstellung seiner beiden Maltasen. Zu den Gluco-maltasen gehört nach weiteren Befunden (**270**) auch die Taka-maltase von *Aspergillus oryzae*, die auch nach der ph-Aktiv.-Kurve (Opt. ph = 4—4,5) der des Malzes gleicht. Auch sie spaltet weder Methylglucosid noch Maltosazon. Ihre nähere Affinität zur α-Glucose scheint dadurch wahrscheinlich, daß sie α, β-Gleichgewichtsmaltose schneller spaltet als reine β; reine α ist noch nicht dargestellt. Nachdem dann WEIDENHAGEN **271)** diese Befunde an Takamaltase beanstandet und die Nicht-spaltung von Methyl-glucosid auf zu geringe Konz. an Enzym bezogen hatte, wiesen PRINGSHEIM c.s. **272)** diese Nicht-spaltung auch dann nach, wenn zum Vergleich eine Hefen-maltase von gleich geringer Zahl von Einheiten verwendet wurde. Diese zerlegte Methylglucosid schneller als Maltose, während *Aspergillus Wentii* diese zu 80 %, Methylglucosid aber garnicht angriff. MYRBÄCK **264)** hat diese Angaben voll bestätigt. In einem anderen Fall enthielt ein Taka-präparat etwas auf Methyl-glucosid wirksames Ferment. Dieser scheinbar so schlagende Versuch wurde aber von WEIDENHAGEN **273)** wieder auf eine relative Spezifität zurückgeführt dadurch, daß er die Spaltbarkeit zwar nicht von Methyl-, wohl aber von Phenolglucosid durch beide sog. Glucomaltasen, Taka und Malz, zeigen konnte. Inzwischen hatten PRINGSHEIM c.s. **274)** weitere Derivate der Maltose untersucht, nämlich Maltoson und Maltobionsäure. Die Ergebnisse waren folgende:

Substrat	Gerstenmalz	Taka	Asp. wentii	Hefe
Maltose	+	+	+	+
α-Methylglucosid	—	—	—	+
Maltobionsäure (Ca-Salz)		+	+	—
Maltoson		+	—	+

269a) ***H. Tauber, I. S. Kleiner,*** Spec. of α-glucosidases. Jl. of biol. Chem. **105**, XCI (1934). — 270) ***J. Leibowitz, P. Mechlinski,*** Takamaltase und Takasacch. Zs. phys. Chem., **154**, 64 (1925). — 271) ***R. Weidenhagen,*** Spez. der enz. Maltosespalt. Zs. V. D. Zuck., **78**, 788 (1928). — 272) ***H. Pringsheim, H. Borchardt, F. Loew,*** Spec. der Sacch. Zs. phys. Chem., **202**, 23 (1931). — 273) ***R. Weidenhagen,*** Spec. der α-Glucosidase. Zs. phys. Chem. **216**, 255 (1933). — 274) ***H. Pringsheim, F. Loew,*** Spez. der Sacch. II. Zs. phys. Chem., **207**, 241 (1932).

Diese Befunde sind nun nicht grade sehr wertvolle Stützen für die Zwei-maltasentheorie: wenn Maltoson von beiden, andererseits Maltobionsäure grade von der Gluco-maltase, nicht von Hefe gespalten wird, bei denen beiden die freie Glucose-gruppe verändert ist, so muß PRINGSHEIM selbst zugeben, daß die Veränderung der Glucosegruppe auch die Angriffskraft der Glucosidomaltase beeinflussen kann. Nun sind aber diese Beobachtungen an Maltobionsäure nicht einmal voll zutreffend. Denn nach NEUBERG c.s. **275)** gilt diese Nicht-Spaltbarkeit von Maltobionsäure nur teilweise: Maltobionsäure wird durch Enzym aus frischen Unterhefen (bis zu 50 %) zerlegt, während Enzym aus obergäriger Preßhefe nicht spaltet. Diese Verschiedenheit in der relativen Spezifität der Hefen ist um so seltsamer, als man eigentlich das Gegenteil hätte erwarten sollen, da nach WILLSTÄTTER c.s. (l. c. 252) Preßhefen häufig grade besonders stark auf Methyl-glucosid wirken. Diese Befunde sind also bisher überhaupt in kein System zu bringen und lassen sich jedenfalls nicht als Beweis für zwei Maltasen verwenden.

Nicht viel anders steht es bei Bakterien. Hier erhielt HOFMANN **275a)** sehr wechselnde Resultate, wechselnd auch nach dem Nährboden. Das nicht näher benannte „Sulfatase-Bakterium" ergab z. B. auf Bierwürze ein Enzympräparat, das auch α-Methylglucosid angreift, bei Züchtung auf Fleischextrakt-Pepton aber nur Phenolglucosid. Trockenpräparat von *B. Delbrücki* spaltet Maltose und beide α-Glucoside, *B. coli* auf Bierwürze nur Maltose, nicht einmal Phenol-glucosid. Bei dieser Sachlage hilft es auch wenig, wenn nun wieder bei anderen Maltasen die Wirkung auf α-Methylglucosid vermißt wird, so bei tierischen Maltasen aus Brustdrüse und Speichel, sowie von *Solanum indicum* (TAUBER u. KLEINER, l. c. 267, 269a, **276)**), die sie somit als Gluco-maltase = Pseudo-α-glucosidase deklariren; denn solche Beobachtungen sind ja längst bekannt. Im übrigen greift auch hier wieder die letztere Maltase zwar Methyl-glucosid nicht, wohl aber langsam Phenolglucosid an.

Wir können also nur unseren Schluß wiederholen: die Zweimaltasen-Theorie ist nicht erwiesen, und nach der Spaltbarkeit der Phenol-glucoside geradezu unwahrscheinlich. Vorläufig kann man nach m.M. mit einer Maltase mit etwas breiter relativer Spezifität auskommen.

Zum Schluß sei noch ohne Rücksicht auf die relative Spezifität oder die Zwei-Maltasen-Theorie zusammengestellt, was überhaupt durch Maltasen gespalten resp. nicht gespalten wird. Da es sich natürlich nur um α-Glucoside handelt, ist das α weggelassen.

Spaltbar	Unspaltbar
a) Holoside und Derivate.	
Maltose (α, β > β) **(270)**	
Maltobionsäure (Unterhefe) **(275)**	Maltobionsäure (Oberhefe) **(275)**.
α-Keto-malturonsäure (d-Glucosido-d-fructuronsäure) **(277)**	
Maltoson (*l. c. 310*)	
Maltosazon (*l. c. 309*)	
β-Methyl-maltosid (*l. c. 310a*)	
Maltose-carbonsäure **(278)** (zu 40 %)	
Ureido-maltose (in Glucose + Glucose-ureid) **(279)**	
Maltose-PhS (OHMYIA l. c. 107).	

275) ***C. Neuberg, E. Hofmann,*** Enzym. Spalt. der Maltobionsäure etc. Biochem. Zs., **252,** 434 (1932). S.A. — 275a) ***E. Hofmann,*** Glucosidasen bzw. Galaktosidasen etc. in Bakterien. Biochem. Zs., **272,** 133 (1934). S.A. — 276) ***H. Tauber, I. S. Kleiner,*** Some Enz. of Solanum indicum. Jl. of Biol. Chem., **105,** 679 (1934); BPh **82,** 496. — 277) ***T. Kitasato,*** d-Tagaturonsäure und d-Glucosido-fructurons. Biochem. Zs., **207,** 217 (1929). — 278) ***P. Pratesi,*** Enz. Spalt. v. Maltose-carbons. etc. Biochem. Zs., **267,** 238 (1933). — 279) ***E. Hofmann,*** Phys. Verh. der . . . Ureidomaltose. Biochem. Zs. **258,** 462 (1932).

b) Heteroside

(außer den eingehend besprochenen einfachen Alkyl-, Phenol-etc.-Glykosiden).

Spaltbar.	Nicht spaltbar.
Glucoside des o-Kresol und Saligenin (im Gegensatz zu den β nicht schneller als Phenolglucosid selbst) (281)	6-Methyl-methylglucosid
l-Menthol-Glucosid (282)	Anhydro-methylglucosid
	Methylglucosid-chlorhydrin
	Methyl-d-isorhamnosid (HELFERICH 280) 281)
	Methyl-glucosido-PhS (OHMYIA l. c. 107)

Die aus Stärke darstellbare Amylo-hexaose (WALDSCHMIDT-LEITZ 283)) wird nicht mehr angegriffen, nur durch Amylasen. Hier hört also die Spezifität der α-Glucosidase auf, während die β-Glucosidase Cello-hexaose noch spaltet. Umgekehrt sind alle synthetischen Maltoside nach HELFERICH 283a), auch z. B. Phenol-maltosid gegen alle Arten Amylase resistent.

Über die synthetische Wirkung der Maltase s. § 302. Wesentlich Neues liegt nicht vor.

b) Darstellung und Eigenschaften.

§ 325 (*H. W.* § *324*). Der wichtigste Fortschritt in der Reindarstellung der Maltase ist die bereits § 315 erwähnte völlige Trennung von Saccharase, die WILLSTÄTTER u. BAMANN 284) an Hefenenzymen gelungen ist. Das Prinzip der Trennung ist Anwendung geeigneter besonderer Adsorbentia, die selektiv nur Maltase adsorbiren. Am besten eignet sich ein Tonerde-gel der Formel AlOOH bei 0°. Man läßt Brauereihefe nur kurze Zeit autolysiren, bis die schneller freigelegte Maltase gelöst ist, und adsorbirt mit der Tonerde. Das Eluat mit Eiswasser ist praktisch frei von Saccharase. Genaue Beschreibung des Verfahrens s. BAMANN im H. W. Bd. III, S. 862. Verbesserung der Methode bei WEIDENHAGEN 285); er verwendet frisches Al-Hydroxyd B.

Zustand der Maltase in den Zellen. WILLSTÄTTER u. ROHDEWALD 286), 287) haben die Bindungsverhältnisse der M. sowohl in Hefen wie in Leukocyten mit denselben Methoden wie bei der Amylase untersucht. In beiden Fällen steht die M. an der Grenze zwischen eigentlichen Desmo-enzymen und Endo-enzymen (§ 310). Bei den Leukocyten geht keine wirksame M. in den Glycerol-extrakt über. Nach der Behandlung mit Glycerol enthalten die Zellreste eine in Glycerol unlösliche M., ebenso wenn man diese dann mit 2 %-iger Dinatrium-phosphatlösung behandelt. Dabei geht aber auch etwas M. in das Phosphat über. Die Gesamtwirkung scheint dabei erhöht zu werden, wohl durch Entfernung von Hemmungskörpern. Diese phosphatlösliche M. wird ebenso durch Glycerol gehemmt wie die zurückgehaltene. Die Zwischenstellung zwischen Desmo- und Endoenzym zeigt sich bei den Leukocyten darin, daß ebensowohl feinste Zerreibung, wie auch

---

280) ***B. Helferich, W. Klein, W. Schäfer,*** Spec. der α-Glucosidase. Ber. Chem. Ges., **59,** 79 (1926). — 281) ***B. Helferich, U. Lampert, G. Sparmberg,*** α-Glucosidase aus Hefe. Ber. Chem. Ges., **67,** 1808 (1934). S.A. — 282) ***C. Neuberg, K. P. Jacobsohn, J. Wagner,*** Bild. u. Spalt. von Glykos. Fermentforsch., **10,** 491 (1929). — 283) ***E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel,*** Krist. Hexaose aus Stärke, Zs. phys. Chem. **223,** 76 (1934). S.A. — 283a) ***B. Helferich, S. R. Petersen,*** Synth. einiger α-Maltoside. Ber. Chem. Ges., **68,** 790 (1935). — 284) ***R. Willstätter, E. Bamann,*** Trenn. von Malt. und Sacch. Zs. phys. Chem. **151,** 273 (1926). S.A. — 285) ***R. Weidenhagen,*** Trenn. von α-Glucosidase etc. Zs. V. D. Zuck., **80,** 155 (1930). — 286) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Zustand der zuckerspalt. Enz. in der Hefezelle. Zs. phys. Chem., **209,** 38 (1932). S.A. — 287) ***Dies.,*** Maltase der Leucoc. ebd. **209,** 33 (1932). S.A.

Behandlung mit Papain die M. freisetzt, also wie bei der Saccharase der Hefen (§ 310). Leukocyten geben auch etwas Lyomaltase ab; sie ist aber eben im Glycerolextrakt völlig gehemmt.

Die **Verfahren der praktischen Darstellung** von M. aus der Hefe sind seit den letzten im H. W. (*l. c. 322*) berichteten verbessert worden, besonders um die stark schädigende Säuerung auszuschalten, und unter Benutzung der Tatsache, daß M. rascher in Lösung geht als Saccharase. WILLSTÄTTER u. BAMANN **288)** verwenden entweder Verflüssigung der scharf abgepreßten Hefe mit Essigester, dann Verdünnen mit Wasser, wobei in 24 h 95—100 % der M. in Lösung gehen; oder Verreiben mit Di-ammonphosphat und Verdünnen, wobei die Auflösung nur 4—6 h dauert. Näh. H. W. Bd. III, S. 861. Bei 0° nimmt beim Altern der Autolysate die Wirksamkeit zunächst stark zu (s. u.). Nach KRIEBLE **289)** gibt Trockenhefe bei neutraler Reaktion und 15° die besten Ausbeuten. Aus Leukocyten erhält man nach **(287)** in etwa derselben Weise wirksame Extrakte.

Die anderen Maltasen sind noch nicht so weit gereinigt. Von hochwertigen Präparaten kann man höchstens noch bei der M. des Gerstenmalzes sprechen.

Hier erzielten PRINGSHEIM c.s. **290), 291)** eine Trennung von Amylase durch Adsorption an Kaolin bei Gegenwart von Alkohol; nach mehrfacher Adsorption ergab sich ein maltasefreies Eluat; auch mit Glycerol oder Glykol kann man beide Enzyme trennen; man kann aber immer nur maltasefreie Amylase erhalten, nicht umgekehrt. LEIBOWITZ (l. c. 268, 270) hat eine gewisse Reinigung der Maltase durch Dialyse erzielt.

Neuer mikrochemischer Nachweis der Spaltung von Maltose durch kolorimetrische Messung, bis auf 0,001 mg. genau KRIJGSMAN **292)**.

Maltase ist auch für die modernen Untersuchungsmethoden ein schwierig zu behandelndes Ferment wegen seiner großen Unbeständigkeit und seines sehr wechselnden Verhaltens. In Autolysaten wird es bei 30° binnen eines Tages vernichtet, bei Zimmertemp. in wenigen Tagen. Bei 0° ist M. eine Woche lang unverändert wirksam, dann beginnt ein langsames Absinken ohne Änderung der Kinetik (WILLSTÄTTER u. BAMANN **288)**).

Dabei steigt in den ersten Tagen die Wirksamkeit stark an, weil anscheinend ein Hemmungskörper entfernt wird. Maltase aus Malz und Taka ist nach LEIBOWITZ viel beständiger, besonders gegen saure Reaktion, die Hefenmaltase schnell zerstört. Bisher hat man infolgedessen den schnellen Aktivitätsverlust bei der Autolyse der Hefen vor allem eben auf die Säuerung zurückgeführt; daneben spielen auch Proteasen mit, wie auch WILLSTÄTTER annimmt, und die TAUBER **293)** für besonders wichtig hält, da Trypsin M. zerstört. Andererseits läßt sich wie erwähnt, M. der Leukocyten durch Papain freisetzen, mehrfache Behandlung zerstört sie allerdings (l. c. 287).

Noch weiter erschwert wird das quantitative Studium der M. dadurch, daß es nicht möglich ist, wahre Enzym-einheiten festzulegen. Das Ferment ändert seine **Kinetik** mit jeder Stufe der Darstellung und Reinigung; es wirkt anders in der Hefe selbst resp. rohen Extrakten, anders in Adsorbaten und Eluaten, auch verschieden bei verschiedenen Substraten. Schon durch Eintragen von Tonerde in eine rohe Maltase-lösung wird die

---

288) ***R. Willstätter, E. Bamann,*** Hefemaltase VI. Zs. phys. Chem., **151,** 242 (1926). S.A. — 289) ***V. K. Krieble c.s.,*** Extract. of malt. from yeast. Jl. Amer. Chem. Soc., **49,** 1728 (1927). — 290) ***H. Pringsheim, A. Genin, R. Perewoski,*** Trenn. der Ferm. des Gerstenmalzes. Biochem. Zs., **164,** 117 (1925). — 291) ***H. Pringsheim, E. Thilo,*** Trenn. der Ferm. des Gerstenmalzes. ebd. **208,** 99 (1928). — 292) ***B. J. Krijgsman,*** Photometr. Mikrobest. von Amylase und Maltase. Zs. phys. Chem., **230,** 190 (1934). — 293) ***H. Tauber, I. S. Kleiner,*** Dig. and inact. of maltase by trypsin etc. Jl. of gen. Phys., **16,** 767 (1933).

Kinetik verändert, und zwar wird die Spaltung langsamer (288) (Abb. 19); es scheint durch die Tonerde ein Stoff entfernt zu werden, der gegen die Hemmung durch Glucose wirkt, so daß also Glucose stärker hemmen kann.

Man kann also nur scheinbare Einheiten festlegen, die scheinbare Maltase-Einheit, diese wird nach 288), S. 252, wie folgt definirt (Näh. H. W. Bd. III, 856).

„*Die* **scheinbare Maltase-Einheit** *M-[e] ist die Enzymmenge in 1 g. Trockensubstanz vom Zeitwert 1, also die Enzymmenge, welche 2,5 g Maltose-hydrat in 50 ccm Lösung bei ph = 6,8 und bei 30° zu 50 % in 1 Minute spaltet*". „*M. W.* **(Maltase-Wert)** *ist die im 1000 fachen der unserer Bestimmung zu grunde liegenden Menge enthaltene Anzahl von Einheiten, also die Anzahl in 1 kg Trockenhefe. Der Ausdruck M-[e] ist zweckmässig noch durch Angabe der Kinetik zu ergänzen, die der Berechnung zugrunde liegt, z. B. [e_1] [e_2] je nach den Zeit-Umsatzkurven*".

Abb. 19. Verlauf der Maltosespaltung nach 288). A. mit Autolysat. B. mit Autolysat + Tonerde.

Die Bestimmung der Maltase in den Hefen erfolgt ebenso durch rasche Autolyse und Zusatz von Toluol, um die direkte Vergärung (294) auszuschalten.

§ 326 (*H. W.* § *325*). **Einfluß äusserer Faktoren.** Temperatur optimal nach Isaiev 295) 30,35, thermischer Koeffic. 1,26 für Hefenmaltase. Für Blut gibt Compton (l. c. 307) 55° an. Für Maltase aus *Sorghum vulgare* (Negerhirse) gibt Acharya **295a)** an: Opt. 48°, bei 60° in 15′ zerstört.

Optimaler ph. Wie bei den anderen Oligasen schwankt der ph bei den einzelnen Gruppen der Mikroben und Phanerogamen ziemlich erheblich. Wie bei den Saccharasen scheinen gewisse biologische Regelmäßigkeiten hier obzuwalten. Die Bakterien haben wieder den höchsten opt. ph, der dann über die Hefen und Spalthefen zu den Schimmelpilzen absinkt; bei den Samen ist er gleich dem der Schimmelpilze, bei anderen Organen höherer Pflanzen wieder höher. Hofmann (l. c. 191) hat die Zahlen in einer Tabelle zusammengestellt, die hier wiedergegeben sei.

ph-Optima der Maltasen nach Hofmann (l. c. 191).

Ferment hergestellt aus	Art	ph	Autor
Bakterien	B. coli	7	H. Karström 259)
„	B. Delbrücki	6,5	E. Hofmann 275a)
„	Sulfatasebakterien	6,2—6,5	
Hefen	untergärige Hefe	6,2—6,8	R. Willstätter, R. Kuhn und H. Sobotka 252)
„	„ „	6,8	
Spalthefen	Schizo-Saccharomyces octosporus, Schizo-Saccharomyces Pombe, Schizo-Saccharomyces mellacei	4,5	E. Hofmann 258)
Schimmelpilzen	Asp. oryzae (Taka-diastase)	4,5	J. Leibowitz 270)
„	Asp. niger	4,2—4,6	E. Hofmann 191)
Phanerogamen	aus Gerstenmalz	4,5	J. Leibowitz 268)
„	Solanum indicum	5,5	H. Tauber u. I. S. Kleiner 276)

294) ***R. Willstätter, E. Bamann,*** Direkte Maltosegär. durch maltasereiche Hefe. Zs. phys. Chem., **152**, 202 (1926). S.A. — 295) ***V. J. Isaiev,*** Yeast maltase. Jl. of Inst. Brewing, **32**, 552 (1926). S.A.

Den ph von 4,5 bei *Asp. Oryzae* hat Leibowitz (l. c. 270) seiner Glucomaltase zugeschrieben, ebenso den gleichen der Gerstenmalzmaltase (l. c. 268); jedoch hat die Beziehung Gluco- oder Glucosidomalt. nichts mit dem ph zu tun, denn die wirkungsgleiche M. der Brustdrüse (Tauber u. Kleiner l. c. 267) hat den gleichen opt. ph wie die Hefenmaltase (6,8—7,0), ebenso die des Blutes (6,6) (Kokuryo **296**)) und die von *Cyprinus* (Karpfen) (Vonk l. c. 305). Die M. aus gemälztem *Sorghum vulgare*, die der Malzmaltase ähnelt, hat den gleichen niedrigen opt. ph wie die der Gerste (4,2) (Acharya **295a**)).

Ebenso wenig aber spricht ein abweichender ph nun etwa für Glucosaccharase anstatt Maltase: Hofmann (l. c. 258) fand den gleichen niederen opt. ph wie für Taka auch bei *Schizosacch.* (*octosporus*, *Pombe* und *mellacei*), deren Maltase Saccharose überhaupt nicht, bei keinem ph angreift.

Abb. 20. ph-Aktiv.-Kurve der Maltase nach Willstätter und Bamann 288)

Den opt. ph der Hefenmalt. haben Willstätter u. Bamann (l. c. 288) nochmals bestimmt zu 6,75—7,25. 6,1 schädigt schon erheblich, 7,5 weniger, im Gegensatz zu Isaiev **295**), der als Opt. 6,1—6,7 fand.

Salze haben im allgemeinen wenig Einfluß; Blutmalt. soll aktivirt werden durch NaCl, auch NaF zu 0,5 % (**296**).

Glucose hemmt, wie längst bekannt (Armstrong, *l. c. 334*); nach Willstätter u. Bamann **295**) bei ph = 5,7—6,8 um 50—65 %.

Zerstörung durch **Alkohol**, Aceton, Wasser, Säuren, Alkalien Isaiev **295**). Totale Hemmung der M. der Leukocyten durch 10 %-iges **Glycerol** Willstätter (l. c. 287), ebenso bei Malzmaltase Pringsheim u. Thilo (l. c. 291) und bei *Sorghum* (**295a**).

Inaktivirung durch Trypsin Tauber c.s. (l. c. 293); Papain wirkt viel schwächer, aber doch bei wiederholter Behandlung inaktivirend (l. c. 287).

c) Vorkommen der Maltase *).

§ **327**. Über die Maltase der Hefen ist seit dem Erscheinen des H. W. nichts prinzipiell Neues festgestellt worden. Sie findet sich eben überall in allen eigentlichen Hefen; auf die geringen Unterschiede in der spezifischen Wirkung auf die verschiedenen Substrate ist am geeigneten Orte hingewiesen worden, so das wechselnde Verhalten gegenüber den synthetischen Glucosiden, gegen Maltobionsäure etc.

Unter den echten Saccharomyces-Arten sind neue nicht bekannt geworden, denen Maltase fehlt, es bleibt also bei den schon lange bekannten Arten *Saccharomyces marxianus, exiguus, ludwigii*. Ferner fehlt Maltase der neuen Gattung *Pseudosaccharomyces*, die nunmehr als echte Arten die früheren Unterarten der Art *Saccharomyces apiculatus Reess* enthält; dieser Gattung fehlt auch die Saccharase.

Die direkte Vergärung von Maltose durch Hefen ohne vorherige Spaltung ist von Willstätter u. Bamann (l. c. 294) weiter untersucht worden; darauf kommen wir beim Kap. Zuckerabbau resp. Zymase zurück.

---

*) Detaillirte Angaben über das Vorkommen aller Oligasen bei Roman **296a**).

295a) ***C. N. Acharya***, Hydrol. of starch by the enz. of Sorghum. Indian Jl. Agr. Sci., **4**, 476 (1934). — 296) ***T. Kokuryo***, Maltase III. Jap. Jl. Med. Sci. Trans. II. Biochem., **2**, 161 (1933); BPh **74**, 144. — 296a) ***W. Roman***, Carbohydrasen. Tab. Biol. Per. **5**, S. 318 (1935).

Von sonstigen **Kryptogamen** ist am besten bekannt die Takamaltase von *Aspergillus oryzae*, die als Gluco-maltase angesehen wird (§ 324) und sich auch durch anderes ph-Opt. von der der Hefe unterscheidet; sie ist eben dadurch bekannter geworden, nachdem sie LEIBOWITZ (l. c. 270) neu bearbeitet hatte. Ihr Vorkommen neben β-Glucosidase ist weiterhin noch von MATSUMOTO **297)** angegeben worden.

Bakterien scheinen fast stets M. zu enthalten. NEILL u. FLEMING **298), 299)** fanden sie in Meningokokken und Pneumokokken. Bei ersteren fehlt Spaltung von Saccharose, wie bei den §§ 300, 321 erwähnten Coli-stämmen (l. c. 259, 262, 266). Ebenfalls in *B. coli* Maltase gefunden von HOFMANN, sowie in *B. delbrücki* und dem Sulfatasebakterium (l. c. 191, **300)**). *Termobacterium mobile* scheint nach FORSSMANN (l. c. 143) keinerlei Glucosidase, weder α noch β, zu enthalten.

Bei **höheren Pflanzen** hat die erneute gründliche Bearbeitung der wenig bekannten M. des **Gerstenmalzes** durch PRINGSHEIM c.s. (l. c. 290, 291) und vor Allem LEIBOWITZ (l. c. 268) großes Interesse erweckt, weil diese Arbeiten der Ausgangspunkt der Diskussion über die beiden Maltasetypen waren (§ 324). Diese M. unterscheidet sich abgesehen von ihrer abweichenden spezifischen Wirkung auch äusserlich von der Hefenmaltase, hat z. B. denselben opt. ph wie die Takamaltase; ebenso die von *Sorghum* (**295a)**). Auch diese ist in den unreifen Samen unlöslich, wird bei der Keimung löslich (H. W. § 327).

Dagegen hat bei gleicher Wirkung die M. der Früchte von *Solanum indicum* einen höheren opt. ph, als die der Hefen, so daß also die Wirkungsverschiebungen damit nicht zusammenhängen (TAUBER u. KLEINER **301)**). ROSENTHALER fand **(302)** in *Phaseolus lunatus* L. eine Maltase, die auch Methylglucosid spaltet. Interessant ist ferner, daß im Gegensatz zu allen früheren Annahmen auch das echte Emulsin, das der Mandeln, eine freilich sehr schwache α-Glucosidase enthält, die durch Spaltung von α-Phenolglucosid nachweisbar ist (HELFERICH u. APPEL **303)**), vgl. Tabelle § 343.

§ 328. Tierische Maltasen. Auf dem Gebiete der tierischen Maltasen ist nur wenig gearbeitet worden, und mit Ausnahme der gründlichen Untersuchungen von WILLSTÄTTER u. ROHDEWALD an der M. der Leukocyten mit ihren wichtigen Konsequenzen für die Gesamtlehre vom Zustand der Enzyme in den Zellen (s. u.) sind die Ergebnisse von keiner besonderen Bedeutung. Rein casuistische Mitteilungen über Vorkommen von M. in irgend welchen tierischen Zellen oder Organen haben insofern keine erhebliche Wichtigkeit, als wir wohl annehmen dürfen, daß M. als ständiger Begleiter der Amylasen überall vorkommt, wo Stärke oder Glykogen in den Zellen abgebaut wird, also sozusagen in jeder Zelle. Andererseits liegen quantitative Untersuchungen von biologischem Werte auch heute noch kaum vor, was bei dem schwierigen Arbeiten mit M. nicht zu verwundern ist. Deshalb sind glücklicherweise der Wissenschaft auch jene unzähligen und zum großen Teile gänzlich überflüssigen Arbeiten erspart geblieben, die wir bei anderen

---

297) ***A. Matsumoto***, α- und β-Gluc. in Takadiastase. Act. Scholae Med. Kioto, **10**, 285. (1928); BPh **47**, 816. — 298) ***James M. Neill, E. L. Gaspari***, Meningoc. maltase. Jl. of Exp. Med. **45**, 151 (1927). — 299) ***W. L. Fleming, J. M. Neill***, Pneumoc. maltase and lact. ebd. **45**, 169 (1927). — 300) ***E. Hofmann***, Glykosidasen etc. in Bakt. Biochem. Zs., **272**, 133 (1934). S.A. — 301) ***H. Tauber, I. S. Kleiner***, Some Enz. of Solanum ind. Jl. of Biol. Chem., **105**, 679 (1934). — 302) ***L. Rosenthaler***, Enz. der Mondbohne. Fermentforsch., **8**, 282 (1925). — 303) ***B. Helferich, H. Appel***, Emulsin VI. Zs. phys. Chem., **205**, 231 (1932). S.A.

Fermenten kurz referiren mußten, weil sie eben nun einmal publizirt sind, jene Arbeiten mit verfehlter Problemstellung und mangelhafter Methodik, die sich bemühen, aus irgend welchen zahlenmäßigen Änderungen des Fermentgehaltes von Organen oder Sekreten die weittragendsten Schlußfolgerungen auf physiologische oder pathologische Prozesse zu ziehen. Solche Arbeiten fehlen hier, und wir können uns somit erfreulicherweise kurz fassen.

Aus den rein casuistischen Mitteilungen sei noch die Arbeit von TAUBER u. KLEINER (l. c. 267) über die Maltase aus Brustdrüse und Speichel herausgehoben, weil sie ein wenn auch beschränktes theoretisches Interesse hat. Die Autoren haben nämlich bei diesen Maltasen erneut gefunden, daß sie die synthetischen Glucoside nicht angreifen und sie deshalb zu den Gluco-maltasen gestellt (§ 324). Die Tatsache an sich, daß tierische Maltasen diese beschränkte Spezifität haben, ist seit EMIL FISCHER (*l. c. 280*) bekannt und bildete bekanntlich den Ausgangspunkt für die moderne Auffassung der relativen Spezifität der M. durch WILLSTÄTTER c.s. (l. c. 252).

Maltasen bei Wirbeltieren: Im Darmkanal findet sie sich bei Säugern und Reptilien (*Testudo*, WOLVEKAMP **304**)) in allen Teilen (im Darm meist mehr als im Pankreas); bei Amphibien und Fischen (*Rana*, *Cyprinus*) nur im Pankreas (VONK c.s. **305**), **306**)), und zwar im Verhältnis zur Amylase von nur ca. 1 : 25. VONK deutet dies als eine Schutzmaßnahme, um die Überschwemmung des Blutes mit zu schnell gebildeter Glucose aus dem Darm zu verhüten, da diese im Gegensatz zur zuerst gebildeten Maltose resorbirt werden kann. Dafür spricht das andere Verhalten bei den Crustaceen: hier ist M. relativ viel reichlicher vorhanden, aber hier ist auch Glucose vom Darm her schwer resorbirbar. Bei *Esox* soll nach VONK die M. auch im Pankreas fehlen. Galle enthält auch bei *Cyprinus* keine M.

Blutmaltase. Hier liegen immer noch sonderbare Unklarheiten vor. Beim Hund hat COMPTON **307**) seine früher angegebenen Untersuchungen (*l. c. 380*) fortgesetzt. Er findet keine nachweisbaren Schwankungen zwischen Hunger und Verdauung. Bei welchen Tieren M. in erheblicher Menge oder überhaupt vorkommt, ist noch ebenso umstritten wie damals, als COMPTON 1921 eine Gruppe von Tieren mit Blutmaltase und eine ohne solche aufgestellt hatte, wobei man sich aber z. B. über die Stellung des Kaninchens durchaus nicht einigen konnte. Dazu sei vermerkt, daß nun wieder HYND c.s. **308**), und noch dazu im Gesamtblut, bei keinem Tier, weder nüchtern noch nach Fütterung, M. finden konnten, mit einziger Ausnahme des Schweines. Daß sie beim Schwein besonders reichlich auftritt, fand auch KOKURYO **309**); er fand sie aber auch sonst, absteigend Hund, Pferd, Hammel, Mensch; er vermißte sie bei Katze, Kaninchen, *Cavia*.

Bei Feten (Darm, Pankreas) nur wenig M. TACHIBANA **310**).

In Ovarialcysten, besonders bei Pseudomucin-cysten TACHIBANA **311**).

Im Harn: Hund und Mensch positiv KOKURYO **309**), beim Menschen reichlich bei Morbus BASEDOW und Tuberkulose, fehlt bei Beriberi und Achylia pancreatica.

M. in den Faeces von Schwein und Hund KRZYWANEK **312**).

Am wichtigsten sind wie gesagt die Befunde an **Leukocyten** von WILLSTÄTTER u.

---

304) ***H. P. Wolvekamp***, Kohlenhydrat-Verdau. im Darm der Schildkröte. Zs. vergl. Phys., **7**, 454 (1928). S. A. — 305) ***H. J. Vonk***, Verdau. bei den Fischen. Zs. vergl. Phys., **5**, 445 (1927). S.A. — 306) ***H. J. Vonk c.s.***, Qu. enz. dans le canal intest. etc. Arch. néerl. Phys., **18**, 580 (1928); BPh **49**, 323. — 307) ***A. Compton***, Malt. in dogs serum etc. Biochem. Jl., **18**, 173 (1924). — 308) ***A. Hynd, M. G. Macfarlane***, Behav. of whole blood tow. maltose etc. Biochem. Jl., **21**, 322 (1927). — 309) ***T. Kokuryo***, Maltase I—IV. Jap. Jl. Med. Sci., Trans. II. Biochem., **2**, (1933); BPh **74**, 144. — 310) ***T. Tachibana***, Phys. invest. of fetus. Jap. Jl. Obst., **12**, 21 (1929); BPh **53**, 399. — 311) ***T. Tachibana***, Ferm. in . . . ovarian cysts. Jap. Jl. Obst., **12**, 50 (1929); BPh **53**, 399. — 312) ***F. W. Krzywanek, Bedi-i Schakir***, Ferm. Geh. der Haustierfäc. Bioch. Zs., **220**, 342 (1930).

ROHDEWALD **313**), die wir bereits § 325 als Beleg für die Lehre vom Zustand der Enzyme in den Zellen herangezogen haben. Wir finden hier bei den Leukocyten ungefähr alle Typen vor, wobei wiederum die Grenze zwischen Desmo-enzymen und Endo-enzymen als nicht mehr scharf erscheint, wie bei den Hefen auch. Die Leukocyten geben auch eine Lyo-maltase ab, wenn man sie mit Glycerol behandelt, aber das Enzym ist in dieser Lösung schon durch 10 %-iges Glycerol völlig gehemmt, so daß diese Lyomaltase zuerst übersehen worden ist. Sie läßt sich aber nachweisen aus der Wirkungsdifferenz der Zellen vor und nach der Behandlung mit Glycerol. Eine weitere Menge Maltase geht in Lösung, wenn man den Zell-rückstand nun mit sek. Na-Phosphat behandelt. Der größte Teil bleibt aber im Rückstand, der sogar (wegen der Beseitigung eines Hemmungskörpers) wirksamer ist als vorher. Diese also unlösliche M. ist aber kein reines Desmo-enzym, steht vielmehr an der Grenze der Endo-enzyme, denn sie ist vollständig auch durch gewaltsame mechanische Zerstörung der „Wände" freizusetzen, geht dann in Glycerol über. Ebenso aber legt auch Verdauung mit Papain die gesamte M. frei. M. steht also zwischen Saccharase, die ein reines Endo-enzym ist, und den eigentlichen Desmo-enzymen.

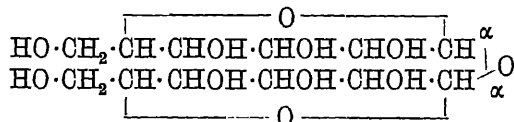
Maltase bei Wirbellosen. Genauer bearbeitet ist die des Seidenspinners *Bombyx mori* von SHINODA **314**). YAMAFUJI **315**) fand bei kranken und schlecht gewachsenen Raupen mehr als bei gesunden. Puppen enthalten nur wenig. Bei Crustaceen im Darmkanal, auch im Magensaft (VONK **306**)); ebenso KRÜGER **316**). Bei der Honigbiene *Apis mellifica* fanden M. BERTHOLF **317**) und PHILLIPS **318**).

Der opt. ph ist verschieden: bei *Helix* 4,7—5,5, bei *Astacus* 6,8 (KRÜGER, l. c. 152), bei *Bombyx* 6,6 (**314**).

3) Trehalase.

§ 330. Die Frage eines Enzyms Trehalase ist noch nicht als geklärt zu betrachten. Es steht weder die Struktur des Zuckers selbst ganz einwandsfrei fest, noch die Frage, ob es ein eigenes nur auf Trehalose eingestelltes Ferment gibt; und wenn es existirt, ob es ein α- oder β-Ferment ist, denn eben die entspr. Konfiguration des Zuckers ist noch nicht sicher.

Trehalose, eine zuerst in der von Pilzen gebildeten Trehala-Manna gefundene Biose (H. W. S. 579) ist ein Glucosido-glucosid der Glucopyranose von folgender Formel:

$$\begin{array}{l} \overline{\quad\quad\quad\quad\quad O \quad\quad\quad\quad\quad} \\ HO{\cdot}CH_2{\cdot}CH{\cdot}CHOH{\cdot}CHOH{\cdot}CHOH{\cdot}CH^{\alpha} \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad O \\ HO{\cdot}CH_2{\cdot}CH{\cdot}CHOH{\cdot}CHOH{\cdot}CHOH{\cdot}CH_{\alpha} \\ \underline{\quad\quad\quad\quad\quad O \quad\quad\quad\quad\quad} \end{array}$$

Die α, α-Konfiguration ist als die bisher angenommene Konfiguration eingesetzt.

Trehalose kommt hauptsächlich bei Pilzen vor und scheint hier nach IWANOFF **319**) den Rohrzucker der höheren Pflanze als Reservestoff biologisch zu vertreten, er fand den Zucker auch bei Myxomyceten, so *Reticularia lycoperdon*. Auch in Hefen, aber nur Oberhefen, findet er sich reichlich, fehlt anscheinend in Unterhefen. (TANRET **320**)).

---

313) ***R. Willstätter, M. Rohdewald***, Malt. der Leucoc. Zs. phys. Chem. **209**, 33 (1932). S.A. — 314) ***O. Shinoda***, Dig. enz. of the silkworm. Jl. of Biochem., **11**, 345 (1930). — 315) ***K. Yamafuji***, Enz. von Bombyx mori V. Bull. Agr. Ch. Soc. Japan, **10**, H. 1—3 (1934). S.A. — 316) ***P. Krüger, E. Graetz***, Ferm. des Flußkrebsmagensaftes. Zool. Jb., **45**, 463 (1929). S.A. — 317) ***L. M. Bertholf***, Util. of carboh. by honeybee larvae. Jl. of Agric. Res., **35**, 429 (1927). — 318) ***E. F. Phillips***, Util. of carboh. by honeybees. Jl. of Agric. Res., **35**, 385 (1927). — 319) ***N. N. Iwanoff***, Trehalose und Trehalase bei Myxomyceten. Bioch. Zs., **162**, 455 (1925). — 320). ***G. Tanret***, Sur le tréhalose de la levure. C. R., **192**, 1056; Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 598 (1931).

Eine die Struktur beweisende Synthese ist noch nicht gelungen; SCHLUBACH c.s. **321)** haben aus Tetra-acetyl-glucose durch Schmelzen mit $ZnCl_2$ eine noch unreine Trehalose dargestellt, die aber vielleicht wirklich α, α ist. Denn die β, β-Trehalose ist schon 1909 von EMIL FISCHER dargestellt worden, und eine von HAWORTH **322)** dargestellte Neo-trehalose ist wahrscheinlich α, β. Die Struktur als aus 2 Pyranosen bestehend ist von BREDERECK **323)** sichergestellt worden; aber die von HUDSON 1916 (*l. c. 386*) errechnete α, α-Konfiguration ist noch nicht experimentell gesichert. Damit ist also auch die theoretisch wichtige Frage nach der Art des Enzyms noch nicht exakt zu beantworten.

Auch die biochemische Synthese durch das Ferment Trehalase ist noch nicht gelungen, obwohl es eine biochemische Synthese im Zellgeschehen gibt. Denn bei der Phosphorylirung der Zucker entsteht Trehalose-PhS, als regelmäßiges Nebenprodukt (§ 286) und zwar durch eine wahre Synthese aus Glucose, nicht etwa nur aus der vorhandenen Trehalose der Hefe (VEIBEL **324)**). Wahrscheinlich entsteht die in der Hefe vorhandene Trehalose auf diesem Wege, aber damit ist nicht gesagt, daß diese Synthese durch ein spezifisches Ferment Trehalase katalysiert wird, denn die Entstehung der Trehalose-PhS findet auch bei der Glykolyse durch Tierzellen statt, bei denen das Enzym Trehalase fehlt. (Einzige Ausnahme: Karpfenblut, EMIL FISCHER, *l. c. 379*). Dagegen läßt sich eine Spaltung der Trehalose-PhS durch Trehalase von *Aspergillus* nachweisen (BABA **325)**).

Über das Enzym **Trehalase** ist immer noch sehr wenig bekannt, was um so mehr zu bedauern ist, als seine Existenz oder Nicht-existenz wichtig wäre für die Frage der Einheitlichkeit der α-Glucosidasen. Es ist mit Ausnahme des soeben erwähnten singulären Vorkommens im Karpfenblut ganz auf Pflanzen beschränkt. So findet es sich (nach *l. c. 391* nicht regelmäßig) in Hefen, in *Aspergillus, Penicillium* und allerlei anderen Pilzen. IWANOFF **319)** fand es in unreifen Fruchtkörpern des Myxomyceten *Lycogola*, nicht in reifen, ebenso nicht im Mycel von *Aethalium septicum.* Aber auch Mandelemulsin hat Wirkung auf Trehalose (WEIDENHAGEN **326)**), HELFERICH **327)**); die Wirkung geht nicht parallel mit der β-glucosidatischen. Bei Tieren ist das Ferment nicht nachgewiesen, bei Bienen wird nur allgemein angegeben, daß sie Trehalose als Nahrung verwerten können (l. c. 157, 158).

Über die Spezifitätsgrenzen des Enzyms und damit seine Selbständigkeit kann man noch nicht abschließend urteilen. WEIDENHAGEN möchte es einfach seiner allgemeinen α-Glucosidase beiordnen, jedoch fand er selbst **(328)**, daß seine α-Glucosidase, lies Maltase, Trehalose nicht angreift, ebenso PRINGSHEIM **329)**. Ob umgekehrt Trehalase Maltose etc. angreift, ist m. W. nicht geprüft. Ebenso ist die Vermutung HELFERICH's **327)**) nicht experimentell nachgeprüft, daß vielleicht α-Galactosidase (Melibiase) auf Trehalose wirken könnte; indessen scheint diese Annahme dadurch überholt, daß HELFERICH selbst (l. c. 303) eine α-Glucosidase in den Emulsinen nachgewiesen hat. So wissen wir eigentlich noch so gut wie nichts über die Trehalase, weder ob sie ein eigenes Enzym, noch ob sie α oder β ist. Ein genaueres Studium dieses Fermentes wäre also sehr erwünscht.

---

321) ***H. H. Schlubach, K. Maurer,*** Synth. einer Isotrehalose. Ber. Chem. Ges., **58,** 1178 (1925). S.A. — 322) ***W. N. Haworth, W. J. Hickinbottom,*** Synth. of ... neotrehalose. Jl. of Chem. Soc. **1931,** 2847. — 323) ***H. Bredereck,*** Konstit. der Trehalose. Ber. Chem. Ges., **63,** 959 (1930). — 324) ***St. Veibel,*** Trehalosegehalt etc. der Unterhefe. Bioch. Zs., **252,** 305 (1932). S.A. — 325) ***T. Baba,*** Phosphoryl. von Maltose etc. Bioch. Zs., **278,** 207 (1934). — 326) ***R. Weidenhagen,*** Spec. der enz. Maltosespalt. Zs. V. D. Zuck., **78,** 788 (1928). S.A. — 327) ***B. Helferich c.s.,*** Emulsin VII, X. Zs. phys. Chem., **208,** 91 (1932); **215,** 277 (1933). S.A. — 328) ***R. Weidenhagen,*** Spez. u. Wirk. Mech. der zuckerspalt. Enz. Zs. V.D. Zuck., **79,** 115 (139) (1929). S.A. — 329) ***H. Pringsheim c.s.,*** Spec. der Sacch. Zs. phys. Chem. **202,** 23; **207,** 241 (1932/3). S.A.

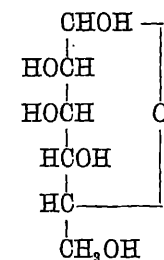
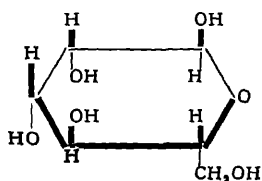
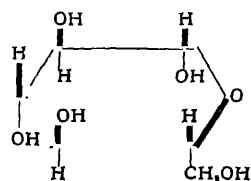
4) Gaultherase.

§ 330. Die Existenz dieses Enzyms ist sehr zweifelhaft. Die Annahme KARRER's, (*l. c. 396*), daß Gaultherin, das Glykosid aus *Gaultheria procumbens*, ein α-Glykosid sei, scheint sich nicht zu bestätigen.

BRIDEL **330), 331)** wies nach, daß das Glykosid aus *Betula lenta*, das Methyl-salicylat als Aglucon enthält, und ebenso das Hauptglykosid aus *G. proc.* identisch ist mit dem Monotropitosid aus *Monotropa*, das Primverose enthält und durch „Rhamno-diastase", d. h. Emulsin zerlegt wird (§ 342). Daneben findet sich in *G. proc.* noch ein neues Glykosid, Gaultheriosid, das überhaupt fermentfest ist. Es besteht aus Glucose, Xylose und Äethylalkohol; da es aber unspaltbar ist, scheint es nicht Primverose, sondern eine andere Xylosido-glucose zu enthalten **(332)**.

5) α-Mannosidase.

Ob man die Substrate dieses im Mandelemulsin gefundenen Sonderenzyms mit Recht als α-Mannoside bezeichnet, ist fraglich, da man die Konfiguration am C-Atom 1 bei der Mannose noch nicht sicher kennt.

Die Bezeichnung α-Mannose ist zunächst einfach rein systematisch nach der HUDSONschen Regel erfolgt, indem man die stärker rechtsdrehende Form α benannt hat. Danach wäre die gewöhnliche freie kristall. Mannose, die links dreht, β. Aber es bestehen allerlei Zweifel, z. B. läßt die Art der Darstellung vermuten, daß die rechtsdrehende Form β ist (RIIBER, vgl. bei PRINGSHEIM **333)**). HUDSON hatte daran gedacht, daß α-Mannose furoid sein soll, β pyroid, jedoch wird dies von HAWORTH **334)** und ISBELL **335)** abgelehnt, welch letzterer aber eine bisher unbekannte Strukturdifferenz nicht ausschließen möchte. Mannose hat also jedenfalls die pyroide Struktur (I); aber die Konfiguration am C 1 ist damit noch nicht geklärt. HELFERICH **336)** lehnt in Übereinstimmung mit FREUDENBERG die Annahme RIIBERS ab; nach seinen Überlegungen hat die stark rechtsdrehende Form der Mannose am C 1 dieselbe Konfiguration wie α-Glucose und somit die Formel II.

I. d-Mannose II. α-d-Mannose. III. β-d-Glucose (zum Vergleich)

Es besteht also immerhin noch eine Möglichkeit, daß die rechtsdrehenden Mannoside β sind, und die Mannosidase somit ebenfalls β.

Diese Frage hatte ein sehr großes theoretisches Interesse, solange HELFERICH

330) ***M. Bridel***, Gluc. à salicyl. de méthyle etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **6**, 659; Jl. de Pharmac. Chim., **30**, 304 (1924). — 331) ***M. Bridel, S. Grillon***, Le glucos. . . . du Gaultheria proc. Bull. Soc. Chim. Biol., **10**, 1326; **11**, 466 (1928/9). — 332) ***J. Rabaté c.s.***, Gaulthérioside etc. ebd. **13**, 604 (1931). — 333) ***H. Pringsheim***, Zuckerchemie, S. 152. Berlin 1925. 334) ***W. N. Haworth***, Konst. einiger Kohlenhydr. Ber. Chem. Ges., **65**, **A**, 43 (50) (1932). — 335) ***H. S. Isbell***, Ring-Struct. of mannose. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **16**, 704 (1930). — 336) ***B. Helferich, S. Winkler***, Emulsin VIII. Zs. phys. Chem., **209**, 269 (1932). S.A.

annahm, daß die sog. Mannosidase im Emulsin mit der β-Glucosidase identisch ist (**336**). Denn dann würde ein β-Ferment, wenn seine Deutung der Konfiguration zutrifft, ein α-Glykosid spalten; mit anderen Worten: es wäre hier nicht die absolute Konfiguration am C 1 entscheidend für die Spaltbarkeit, sondern die gegenseitige Stellung der O-Atome an C 1 und C 2: Transstellung bedingt Spaltbarkeit, Cis-Stellung Unspaltbarkeit durch Emulsin. Die erstere wäre ebenso gegeben bei α-Mannosiden wie bei β-Glucosiden (Formeln II und III).

Indessen ist diese an sich weittragende Überlegung dadurch wesenlos geworden, daß die Mannoside garnicht von der β-Glucosidase gespalten werden, sondern von einer besonderen **Mannosidase**, die also nun im Sinne der HELFERICHschen Konfigurationsdeutung α ist (**337, 338**). Phenol-β-mannosid wird von Emulsin nicht angegriffen **336**)). Das Vorkommen eines α-Enzyms im Emulsin hat ja nichts Verwunderliches mehr, seitdem man auch α-Glucosidase und α-Galactosidase darin gefunden hat.

Dieses Enzym läßt sich dadurch von der β-Glucosidase des Emulsins abtrennen, daß es wesentlich resistenter gegen höhere Temp. ist. Bei 70° geht die Glucosidase zugrunde, die Mannosidase bleibt erhalten, sie wird erst durch Kochen zerstört. Auch gegen U.V.-Strahlen und gegen Fällung mit Ag-Salzen ist das Enzym relativ resistent (HILL **339**)).

Das schon lange aus seiner synthetischen Wirkung her bekannte Enzym (§ 302) kommt auch anderweitig, so in Luzerne (*Medicago sativa*), schwach in Hefen vor. Enzym aus *Termobacterium mobile* spaltet α-Mannoside nicht (FORSSMAN, l. c. 143). Das Enzym der Luzerne ist von HILL **339**) genauer untersucht worden. Es ist von dem der Mandeln nicht zu unterscheiden.

Opt. ph des gereinigten Enzyms 4,0 (vgl. die Abb. 24 § 332).

Die Wirkung dieses Ferments ist bisher nur an synthetischen Heterosiden geprüft. Ob es ein natürliches Substrat für diese Mannosidase gibt, ist nicht bekannt, obgleich man es eigentlich annehmen sollte. Aber natürliche Heteroside der Mannose sind bisher nicht aufgefunden, und die eventuelle Rolle, die dieses Enzym im Stoffwechsel der Mannane in den Pflanzen spielen könnte, ist unbekannt (s. u.).

Bei den synthetischen Substraten zeigt sich auch hier wieder die leichtere Spaltung des Phenol-mannosids (HELFERICH **337**)). Eigenartig ist, daß die Spaltung des Phenol-2-desoxy-Glucosids durch Emulsin von diesem Ferment bewirkt wird (HELFERICH **338**)). Das aus Serumprotein erhältliche Glucosamino-mannosid wird nach RIMINGTON **340**) von Emulsin nicht angegriffen; ebensowenig zerlegt es die synthetischen Acetyl-glucosaminide (HELFERICH **338**)), und die noch acetylirten Abbaustufen des Chitins, für die es im Emulsin eine eigene Chitinase gibt (§ 343).

Diese Mannosidase ist bisher nicht näher untersucht. Man kann deshalb auch über ihre Beziehungen zu der von PRINGSHEIM **341**) im Gerstenmalz aufgefundenen **Mannobiase** noch nichts aussagen, einem Ferment, das also im Stoffwechsel der Mannane als einem Anteil der sog. „Hemicellulosen" eine Rolle spielen sollte, nachdem diese von der Mannanase (der alten Seminase, H. W. S. 757) zuerst in die Mannobiose PRINGSHEIM's aufgespalten sind. PRINGSHEIM hält freilich diese Mannobiose für ein β-Holosid,

---

337) ***B. Helferich, H. Heyne, R. Gootz,*** Emulsin IX. ebd. **214,** 139 (1933). S.A. — 338) ***Ders., A. Iloff,*** Emulsin XIII. ebd. **221,** 252 (1933). S.A. — 339) ***K. Hill,*** Luzerne-Emulsin. Ber. Sächs. Akad. Wiss., **86,** 115 (1934). S.A. — 340) ***Cl. Rimington,*** Isol. of a carboh. deriv. from serum prot. Biochem. Jl., **23,** 430 (1929). — 341) ***H. Pringsheim, A. Genin,*** Ferm. Spalt. des Salepmannans. Zs. phys. Chem., **140,** 299 (1924).

dann müßte das Enzym von der HELFERICH'schen Mannosidase verschieden sein und zwar nach PRINGSHEIM mit der Cellobiase identisch; jedoch sind seine Argumente nicht entscheidend. Wahrscheinlich hat doch dieses Enzym des Emulsins eben die Funktion, im Stoffwechsel der Mannane mitzuwirken. Jedoch fehlt bisher jedes experimentelle Material: es ist weder Gerstenmalz gegen synthetische Mannoside, noch Mannobiose gegen Emulsin-mannosidase geprüft. Man kann also noch nichts über das Verhältnis dieser beiden Enzyme aussagen. Die Verschiedenheit des opt. ph, 4,0 bei Mannosidase, 6,0 bei Mannobiase, will nicht viel besagen.

III. Galactosidasen.

1) α-Galactosidasen, Melibiase.

§ 331. (*H. W.* § *359*). Das Enzym Melibiase, das wir im H. W. noch als eine schwer unterzubringende β-Galactosidase anzusehen hatten, hat inzwischen eine scharf definirte Stellung dadurch bekommen, daß ihr Hauptsubstrat Melibiose als eine α-Galactosido-glucose erkannt worden ist. Dadurch ist geradezu eine Lücke ausgefüllt worden, denn Spaltungen und Synthesen von α-Galactosiden waren schon vorher bekannt (H. W. §§ 305, 354). Der weitere Wirkungsbereich und die Spezifitätsgrenzen sind wie überall noch nicht sicher zu bestimmen, da immer wieder dieselben Fragen auftreten mit dem Kernproblem, ob besondere Enzyme oder verschiedene relative Spezifitäten. Hier dreht es sich vor allem um zwei Fragen: die Sonderexistenz der Galactoraffinase im Emulsin und die Spaltung der Arabinoside.

Diese letztere Frage ist freilich durch HELFERICH **342—344)** mit größter Wahrscheinlichkeit dahin beantwortet worden, daß die α-Galactosidase auch ohne weiteres die Heteroside der β-l-Arabinose zerlegt, denn diese Pentose entspricht konfigurativ genau der α-d-Galactose. Natürliche Heteroside dieser Arabinose sind bisher freilich nicht aufgefunden; diese Frage der Abhängigkeit der Wirkung von der Konfiguration wird also viel wichtiger bei der β-Galactosidase; denn diese zerlegt auch natürliche Heteroside der α-l-Arabinose, wie der Vicianose (α-l-Arabinosido-glucose), worauf wir § 332 zurückkommen. Jedenfalls aber spaltet Emulsin durch seine α-Galactosidase die synthetischen Heteroside der β-l-Arabinose, nämlich Methyl- und Phenol-β-Arabinosid (HELFERICH **343**)).

Für die systematische Stellung der Melibiase wichtig ist, daß WEIDENHAGEN **345)** den alten Befund von HÉRISSEY (1914) (*l. c. 71*), der später nicht reproduzirt werden konnte, neuerdings bestätigt hat, daß nämlich Melibiase aus Hefe α-Methyl-galactosid spaltet; die Spaltung durch Enzym aus *Helix* hatte BIERRY (*l. c. 737*) angegeben.

Nach HELFERICH **343)** scheint auch Trehalose durch dieses Ferment gespalten zu werden; jedoch dürfte diese Wirkung eher der α-Glucosidase zuzuschreiben sein, nachdem diese auch im Emulsin nachgewiesen ist **(344)** (vgl. § 330). Ob Psychosin, das Galactosid des Sphingosins, durch α- oder β-Galactosidase zerlegt wird, ist nicht zu entscheiden, da die Konfiguration dieses Galactosids nicht bekannt ist **(344)**.

---

342) ***B. Helferich,*** Spec. des Emulsins. Erg. Enzymf. Bd. II, S. 82. Leipzig 1933. — 343) ***Ders. c.s.,*** Emulsin VI, VII. Zs. phys. Chem., **205**, 231; **208**, 91 (1932). S.A. — 344) ***Ders., H. Appel, R. Gootz,*** Emulsin X. ebd. **215**, 277 (1933). S.A. — 345) ***R. Weidenhagen,*** Melibiase I, II. Zs. V. D. Zuck., **77**, 696; **78**, 99 (1927). S.A.

Ein durch Hefe spaltbares, gegen Emulsin („Galactoraffinase", s. u.) resistentes α-Galactosid des Glycerols am β-Hydroxyl ist in Florideen (*Rhodymenia* u. v. a. Rot-algen) von Colin **346)** gefunden worden. Es vertritt hier den völlig fehlenden Rohrzucker. Damit ist die Annahme (**347**), daß es sich um eine Galactosido-xylose handeln könnte, da diese Algen Xylan enthalten, hinfällig geworden.

Ein anderes Problem ist die Spaltung der Raffinose durch Emulsin, während Hefen-melibiase Raffinose kaum angreift. Willstätter c.s. (H. W. S. 630) hatten dies abweichende Enzym vorläufig als **Galacto-raffinase** bezeichnet; sein Verhältnis zur echten Melibiase der Hefen ist auch heute noch nicht befriedigend geklärt. Raffinose ist (Formel § 308) eine α-Galactosido-saccharose, d. h. in deren Glucosekern ist eine Galactose als neuer „Substituent" eingetreten. Es könnte also hier etwa dieselbe Diskussion einsetzen, wie beim Amygdalin betr. das Verhältnis zwischen Gentiobiase und Amygdalase (§ 299). Es könnte also die Galacto-raffinase etwa eine „Galacto-melibiase" sein, also an der Galactosido-bindung ansetzen, während die echte Melibiase der Hefen eine „Gluco-melibiase" wäre, deren Wirkung an der Glucose ansetzt und von deren intakter Struktur abhängig wäre.

Die Frage ist ebenso wenig zu klären wie dort. Der einzige exakte Unterschied liegt im ph, den Willstätter für Galactoraffinase mit 4,1 angegeben haben, während Weidenhagen für das Hefenenzym etwa 5,0 fand (Abb. 21). Sonst verhalten sie sich gleich, z. B. in bezug auf die Kinetik (monomolekulare Reaktion) sowie in der Spaltung anderer Substrate. Daß auch Hefenenzym α-Methyl-galactosid spaltet, haben wir oben angegeben, wie es Emulsin auch tut; beide Enzyme spalten auch das Osazon der Melibiose (Weidenhagen **348**). Man wird also am einfachsten vorläufig damit rechnen, daß Galactoraffinase nichts anderes ist als eben die Melibiase des Emulsins. Es bliebe dann nur noch die Frage zu klären, weshalb Hefen-melibiase die Raffinose so schwach angreift. Hier liegen eben wohl relative Affinitätsunterschiede vor, wie ja auch die Affinität für Saccharose und Raffinose bei der Spaltung durch Fructosidase so weit verschieden ist, daß man lange Zeit an eine eigene Raffinase geglaubt hat, die in den einzelnen Hefen verschieden verteilt ist.

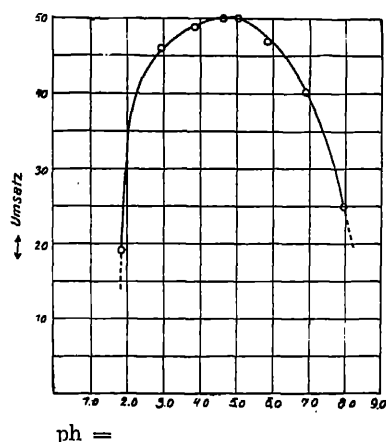



Abb. 21. ph-Abhängigkeit der Melibiase (nach Weidenhagen **345**)).

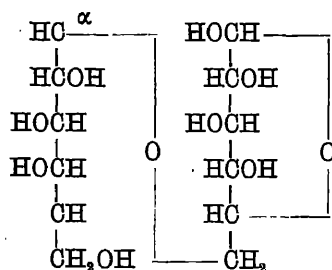
Melibiase kommt nur in Unterhefen vor, das Fehlen in Oberhefen ist allseitig bestätigt. In Milchzuckerhefen (*Saccharom. fragilis*) fehlt nach Neuberg u. Hofmann **349)** Melibiase ebenfalls. Bei *Aspergillus niger* hängt ihre Bildung nach Hofmann **350)** vom Nährboden ab: sie tritt auf, wenn der Pilz auf Raulin'scher Lösung gezüchtet wird, dann wird also Raffinose total gespalten; bei Züchtung auf Raffinose fehlt sie dagegen, und es wird nur Saccharase gebildet.

Ebenso fehlt Melibiase in *Bact. coli*, während *B. delbrücki* sie bildet **(351)**. Auch *Termobacterium mobile* enthält keine M. (Forssman l. c. 143).

Tauber u. Kleiner **351a)** fanden M. in Knollen von *Solanum indicum*.

346) ***H. Colin, E. Guéguen***, Princ. sucré de Rhodymenia. C. R., **191**, 163 (1930); **197**, 1688 (1933). — 347) ***C. Sauvageau, G. Denigès***, Sucre des algues floridées. C. R., **190**, 95 (1930). — 348) ***R. Weidenhagen***, Spec. u. Wirk. Mech. d. zuckerspalt. Enz. Zs. V. D. Zuck., **79**, 115 (138) (1929). S.A. — 349) ***C. Neuberg, E. Hofmann***, β-Glucosidase. Bioch. Zs., **256**, 450 (1932). S.A. — 350) ***E. Hofmann***, Glucoside und Disacch. Spalt. Enz. aus Schimmelpilzen. Bioch. Zs., **273**, 198 (1934). S.A. — 351) ***Ders.***, Vork. von Glykosidasen etc. in Bakt. Bioch. Zs., **272**, 133 (1934). S.A. — 351a) ***H. Tauber, S. Kleiner***, Spec. of α-glucosidase. Jl. of Biol. Chem., **105**, XCI (1934).

Abgeschlossen: 8. 9. 35. Ber. Phys. 87, H. 1/2.

Struktur der Melibiose. Diese Frage ist lange insofern unklar geblieben, als man zwar immer mit der Wahrscheinlichkeit einer 6-Galactosido-glucose gerechnet hatte, aber mit einer β-Konfiguration wie bei Lactose. Eine Synthese von PICTET **352)** aus Di-glucosan + Di-galactosan sagte über die feinere Struktur nichts aus. Erst nachdem HELFERICH **353)** die 6-β-Galactosido-glucose synthetisch hergestellt und von der Melibiose verschieden befunden hatte, wiesen CHARLTON u. HAWORTH **354)**, **355)** die Struktur der M. als einer 6-α-Galactosido-glucose nach, indem sie die optischen Werte nach der HUDSON'schen Berechnung zugrunde legten. Beide Paarlinge sind Pyranosen, Melibiose hat also die nebenstehende Strukturformel. Strukturformel der Raffinose daraus abgeleitet § 308.

```
   α
 HC————         HOCH————
  |      |       |      |
 HCOH    |      HCOH    |
  |      |       |      |
HOCH     |      HOCH    |
  |      O       |      O
HOCH     |      HCOH    |
  |      |       |      |
 CH      |      HC —————
  |      |       |
 CH₂OH    ——————CH₂
```

Diese Formel wurde dann von HELFERICH **356)** durch Synthese der M. aus Aceto-brom galactose + Tetra-acetyl-glucose bestätigt, ferner auf analytischem Wege von LEVENE **357)**, der zeigte, daß die Stellungen 4 und 5 frei sein müssen, also die Glykosidbindung in 6 ansetzen muß. Einen indirekten Beweis führte JOSEPHSON **358)** von der Raffinose ausgehend. In diese kann man nur 3 Triphenylmethylgruppen einführen, sie hat also nur 3 freie CH_2OH-Gruppen, eine in der Galactose, zwei in der Fructose, demnach ist die Glucose in C 6 substituirt. Die synthetische Galactosido-glucose von EMIL FISCHER (1902), (*l. c. 740*) die er für Melibiose hielt, ist nach SCHLUBACH **359)** nicht Melibiose, sondern wahrscheinlich Lactose.

Über das **Enzym Melibiase** ist nicht viel bekannt. Seit WILLSTÄTTER's Untersuchungen über die Galacto-raffinase (*l. c. 805*) hat sich in exakter Weise nur WEIDENHAGEN **345)** mit der M. der Hefen beschäftigt, der bis auf die oben erwähnte Verschiedenheit des ph-Opt. zu einer Identität beider Enzyme gelangt. Bei beiden Enzymen verhalten sich die Zeiten gleichen Umsatzes umgekehrt proportional den Enzymmengen, aber nur bei Rein-Enzymen. Es ist also auch hier wieder die Kinetik abhängig vom Zustand des Enzyms, und so lassen sich wie bei der Maltase wieder bei Roh-Enzymen nur „scheinbare" Melibiase-Einheiten aufstellen, [Me-] E = der Enzymmenge in 1 g Hefetrockensubstanz vom Zeitwert 1; entspricht der Enzymmenge, die 2,625 g Melibiose-hydrat in 50 ccm Lösung bei 30° und ph = 5,0 in einer Minute zu 50 % spaltet.

Zahl der Einheiten in beliebigem Enzym-material wird bestimmt durch die Menge-Zeit-Quotienten, also:

$$\text{Zahl der Me-}[e] = \frac{\text{Gesamtmenge}}{\text{Minutenwert} \times \text{angew. Menge}}$$

Beispiel:

Enzymmaterial	Menge ccm	Halbspaltungswert für 5 ccm	Me - [e]
Melibiaselösung	100	200 Min.	0,1

352) ***A. Pictet, H. Vogel,*** Synth. du mélibiose. Helv. Ch. A., **9,** 806; **10,** 280 (1926/7). — 353) ***B. Helferich, H. Rauch,*** Zuckersynthesen VI. Ber. Chem. Ges., **59,** 2655 (1926). — 354) ***W. Charlton, W. N. Haworth, W. J. Hickinbottom,*** Melibiose etc. Jl. of Chem. Soc. **1927,** 1527. — 355) ***W. N. Haworth, J. V. Loach, Ch. W. Long,*** Maltose and melibiose. ebd. **1927,** 3146. — 356) ***B. Helferich, H. Bredereck,*** Zuckersynthesen VII. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **465,** 166 (1928). — 357) ***P. A. Levene, E. Jorpes,*** Struct. of melibiose. Jl. of Biol. Chem., **86,** 403 (1930). S.A. — 358) ***K. Josephson,*** Triphenylmethylaether etc. (Melibiose) Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **472,** 230 (1929). — 359) ***H. H. Schlubach, W. Rauchenberger,*** Galaktosido-glucose. Ber. Chem. Ges., **58,** 1184 (1925), **59,** 2102 (1926). S.A.

Der Ausdruck Me - [e] ist durch Angabe der Kinetik zu ergänzen, die der Berechnung zugrunde liegt, z. B. Me - $[e]_2$, wobei der Index die Zeitumsatzkurve 2 bezeichnen soll. Für reinere Enzymlösungen nähert sich infolge des Konstantwerdens der Enzymaktivität und der strengeren Proportionalität von Enzymkonzentration und Umsatz die scheinbare Melibiaseeinheit (Me - [e]) der wirklichen Melibiaseeinheit (Me - E).

Als Melibiasewert (Me - W) soll die Zahl der scheinbaren bezw. wirklichen Melibiaseeinheiten in 1 g Trockensubstanz bezeichnet werden.

Zum Vergleich des Gehaltes von Hefe oder Enzymlösung an Melibiase und Saccharase, was im Hinblick auf Trennungsversuche der beiden Enzyme von Wichtigkeit ist. kann nach Anpassung des Melibiasezeitwertes an die „Normal"-Bedingungen die von Willstätter und Bamann (l. c. 288) aufgestellte Saccharase-Vergleichs-Einheit (entsprechend dem Saccharase-Vergleichs-Zeitwert) dienen. Das ist die Enzymmenge, die 2,375 g Rohrzucker in 50 ccm bei 30° und ph = 4,3 in einer Minute zu 50 % spaltet.

Der Melibiasegehalt der untergärigen Bierhefen schwankt in beträchtlichem Maße. Eine Me - [e] ist etwa in 250 g Trockenhefe vom Melibiasezeitwert 250 oder vom Melibiasewert 0,004 enthalten, eine S. V. E. z. B. in 3,0 g Trockenhefe vom Saccharasevergleichszeitwert 3.

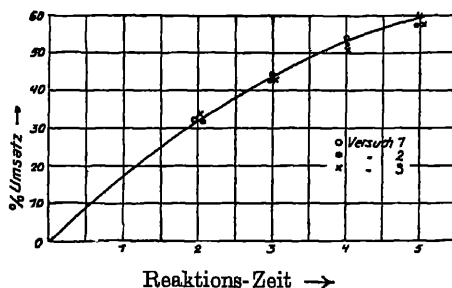



Abb. 22. Zeit-Umsatzkurve der Melibiase nach Weidenhagen 345).

2) β-Galactosidasen, Lactasen.

§ 332. (*H. W.* § *354*). Die Umgrenzung dieses Kapitels leidet an denselben Schwierigkeiten, wie wir sie überall bei den Carbohydrasen vorfinden, der nicht genügend exakten Sicherung der Spezifität. Auch hier haben wir wieder zwei Arten von Substraten, natürliche Holoside und natürliche und synthetische Heteroside. Als Holosid tritt die Lactose, der Milchzucker, in den Vordergrund, daneben noch die ebenfalls natürlich vorkommende Allolactose.

Aber zu diesen zweifellosen Substraten der β-Galactosidasen treten noch die Derivate der α-l-Arabinose hinzu, von denen ein Holosid, die Vicianose, eine α-l-Arabinosidoglucose, natürlich in Heterosiden gebunden vorkommt. Hier sitzt die Heterosid-bindung an der Glucose. Heteroside an der Galactose oder Arabinose kommen natürlich nicht vor, sie sind wie üblich synthetisch hergestellt und als Prüfsteine für die Wirkung der β-Galactosidase verwendet.

Was nun die Spezifität anlangt, so hat Helferich (l. c. 342) nachgewiesen, daß die β-Galactosidasen auch die α-l-Arabinoside angreifen, da diese konfigurativ genau so gebaut sind wie die β-Galactoside. Es wird also zweifellos auch Vicianose durch „Lactase" gespalten, eine eigene „Vicianase" existirt nicht.

Diese Spaltungen sind von Helferich an der Lactase im Emulsin der Mandeln und verwandter Rosaceen untersucht worden. Es gibt aber andere Quellen der Lactase. Das Enzym findet sich in vielen Mikroben, vor allem in Milchzuckerhefen, in der Taka, aber auch in vielen Bakterien, sowie in tierischen Sekreten. Diese verschiedenen Lactasen sind nun jedenfalls nach ihrem äußeren Habitus verschieden, haben z. B. verschiedene ph-Optima. Daneben gibt es aber allerlei noch nicht recht geklärte Angaben über Unterschiede in der spezifischen Wirkung, die wir im H. W. S. 624 einfach registrirt, nicht aber gedeutet haben.

So kam denn ARMSTRONG (*l. c. 763*) lange vor der Aufstellung zweier Saccharasen durch KUHN zu der Anschauung, daß es zwei Lactasen gäbe. Die eine sollte an der Galactosidbindung ansetzen, die andere an der freien Glucose. Wir hätten dann eine Galacto-lactase und eine Gluco-lactase, analog wie sie LEIBOWITZ für die Maltasen postulirt. Die erstere wäre die der Hefen, die Gluco-lactase die der Phanerogamen (Emulsin) und der Tiere. Die Sache ist noch recht wenig geklärt, aber so wie sich ARMSTRONG gedacht hat, stimmt sie doch wohl keineswegs. Er zog seine Schlüsse aus Hemmungserscheinungen: Galactose hemmt die Lactase der Hefen, Glucose die des Emulsins; aber wir wissen heute aus den exakten Forschungen an den Hemmungserscheinungen bei der Saccharase, daß dies ein trügerisches Hilfsmittel ist und man jedenfalls aus diesen Reaktionen allein nicht auf die Sonderexistenz zweier verschiedener Enzyme schließen darf. Dazu kommt, daß ARMSTRONG selbst angibt, daß Emulsin, also seine Gluco-lactase, Galactosido-galactose angreift; dies sprach direkt gegen seine eigene Theorie. Tatsächlich ist sie zunächst in diesem Punkte durch HELFERICH endgiltig widerlegt, der grade durch Emulsin-lactase die β-Galactoside an sich und auch die synthetische β-Galactosido-glucose zerlegen konnte. Nun ist aber auch die Lactase der Mikroben nach den Befunden HOFMANN's (s. u.) eine Galacto-lactase; so bliebe von den Angaben ARMSTRONG's für die „Gluco-lactase" nur noch die tierische Lactase, die noch nicht genügend exakt untersucht ist.

Allerdings sprachen auch andere Befunde gegen eine „Galactosidase"-natur der Lactase des Mandel-emulsins. So sollte nach BIERRY (*l. c. 739*) zwar Hefen-lactase, aber nicht die des Emulsins Lactosazon und Lactobionsäure zerlegen; aber diese Befunde sind nur teilweise bestätigt (s. u.). So ist der Sachverhalt noch sehr wenig geklärt: man könnte wie bei der Saccharase an wechselnde Gemische der beiden Lactasen denken, wenn man nicht vorläufig einfach daran festhalten will, daß dieselbe Lactase wechselnde relative Spezifitäten aufweist, wie wir es in den analogen Fällen auch als das Wahrscheinlichste angenommen haben, besonders bei den Maltasen. Aber auch hier ist vielleicht das letzte Wort noch nicht gesprochen. WEIDENHAGEN (§ 300) lehnt die ganze Theorie zweier Lactasen ab, und in diesem Falle wahrscheinlich mit Recht.

Viel wichtiger ist eine Anregung von HELFERICH, ob nicht etwa die β-Galactosidasen einfach mit den β-Glucosidasen identisch sind. Zunächst giltig nur für die Galactosidase des Emulsins der Mandeln und nahe verwandter Samen, und zunächst auch nur für die β-Hetero-glucosidase; jedoch ist diese Frage einer besonderen Hetero-glucosidase gegenüber der Holosidase Cellobiase-Gentiobiase bisher so undurchsichtig, daß wir hier darauf garnicht eingehen wollen (§§ 333, 336). Wir wollen hier nur die interessanten vergleichenden Messungen mit Emulsin an Heterosiden besprechen.

HELFERICH c.s. **360—362**) haben bei vergleichenden Messungen verschiedener Präparate von Emulsin ein ziemlich weitgehendes Parallelgehen der relativen Spaltungsfähigkeit für β-Glucoside und β-Galactoside festgestellt.

Es fand sich z. B. bei 2 Präparaten von sehr verschiedener absoluter Wirkungsstärke ein Verhältnis von 6,4 für Phenol-glucosid, 6,2 für Phenol-galactosid. Andererseits blieb auch die relative Spaltung beider Glykoside ziemlich konstant: alle Präparate spalteten das Glucosid etwa 10 mal schneller als das Galactosid. In einer anderen Versuchsreihe (**360**) wurden Saligenin-glykoside, sowie Cellobiose und Lactose gegen 4 verschiedenen Emulsin-präparate verglichen. Hier treten etwas größere Schwankungen auf, aber die Tendenz bleibt dieselbe; man könnte nach dieser Tabelle zweifellos zu der Überzeugung kommen, daß alle Substrate,

---

360) ***B. Helferich, R. Gootz, G. Sparmberg***, Emulsin V. Zs. phys. Chem. **205**, 201 (1932). S.A. — 361) ***B. Helferich, S. Winkler, R. Gootz, O. Peters, E. Günther***, Emulsin VII. ebd. **208**, 92 (1932). S.A. — 362) ***B. Helferich, S. Winkler***, Emulsin VIII. ebd. **209**, 269 (1932). S.A.

Holoside wie Heteroside der Glucose wie der Galactose, in diesem Fermentpräparat von einem Ferment mit etwas wechselnder relativer Spezifität gespalten werden, wenn sie nur die β-Konfiguration haben; denn andererseits ergibt sich auch aus diesen Befunden HELFERICH's, (speziell 361)), daß es bei der Wahl zwischen α und β keine relative Spezifität gibt, sondern nur eine absolute. Dasselbe Resultat folgt schließlich aus einer Versuchsreihe (361)) mit Salicin, Phenol-β-galactosid und Phenol-α-l-arabinosid, bei der die Spaltkarkeit des letzteren als unwesentlich kleiner, aber regelmäßig folgend der der Galactoside erhärtet wird.

Aus anderen Befunden (l. c. 377, 338) folgt weiter, daß auch gegen äußere Einwirkungen sich Glucosidase und Galactosidase gleichmäßig verhalten, so bei der Inaktivirung durch Erwärmen, während die Mannosidase erhalten bleibt. Auch die glatte Spaltung von β-Methylmaltosid durch Emulsin spricht nach HELFERICH dafür, daß Veränderungen am C 4 für die Glucosidasewirkung nicht entscheidend wichtig sind; jedoch liegt hier nach PETERSEN (l. c. 19) die Möglichkeit einer eigenen spezifischen β-Maltosidase vor.

Nun stehen wir bei solcher Sachlage immer wieder demselben Dilemma gegenüber: alle diese Zahlen können von vornherein genau so gut dadurch erklärt werden, daß zwei ganz verschiedene Enzyme vorhanden sind, und zwar in einem einigermaßen konstanten Mischungsverhältnis, was bei so nahestehenden biologischen Quellen — Mandeln und verwandte Rosaccen-samen — durchaus nicht unwahrscheinlich ist. Diese Objekte könnten also neben einer an wirksamer Menge überwiegenden Glucosidase eine weniger wirksame Galactosidase enthalten, die auch bei den bisherigen Reinigungsverfahren nicht abgetrennt wird, wie ja bei den normalen Adsorptionen nicht einmal die Maltase von der Saccharase der Hefe geschieden wird. Nur wenn in allen Objekten sich ungefähr gleiche Relationen zwischen diesen beiden Wirkungen auffinden lassen, dann wäre allerdings der Beweis sozusagen geführt. Dies ist nicht der Fall, und so ist HELFERICH selbst in seiner Ansicht schwankend geworden. Sowohl bei den Enzymen anderer Samen wie bei Mikroben können die Relationen ganz andere sein.

NEUBERG u. HOFMANN 363) haben solche Objekte nachgewiesen, bei denen Glucosidase und Galactosidase sich zahlenmäßig ganz verschieden verhalten, und zwar in Organismen ganz verschiedener Stämme. So verhalten sich Milchzuckerhefen (364) ganz anders als das HELFERICH'sche Emulsin: sie greifen Galactoside schneller an als Glucoside; ferner wird hier die Wirkung auf Galactoside durch Galactose, die auf Glucoside durch Glucose gehemmt. Noch schärfer differenzirt erweisen sich einige Bakterien: *B. coli*, *B. delbrücki* greifen Galactoside stark, Glucoside garnicht an (365); umgekehrt verhält sich *Mucor javanicus* (366). Bei *Aspergillus niger* richtet sich das entspr. Verhalten ganz nach dem Nährboden (367): der auf Maltose und Bierwürze gezüchtete Pilz enthielt überhaupt keine Galactosidase. Auch hier treten wieder differenzirte Hemmungserscheinungen auf gegenüber Glucose resp. Galactose.

Noch interessanter war der Nachweis, daß nicht einmal die „Emulsine" der Rosaceen sich konstant nach dem HELFERICH'schen Schema verhalten. HOFMANN 368) zeigte, daß das Enzym der Hagebutte (*Rosa canina*) sich umgekehrt verhält wie das der Mandeln: es zeigt bei starker Wirkung auf Galactoside kaum Wirkung auf Glucoside (Spaltung von Phenol-galactosid 70 %, Phenol-glucosid 3 %); ebenso verhält sich das Emulsin der Mandarinenkerne (*Citrus nobilis*) und der Soja-bohnen (369).

---

363) ***C. Neuberg, E. Hofmann***, β-Glucosidase. Bioch. Zs., **256**, 450 (1932). S.A. — 364) ***E. Hofmann***, β-Glykosidase der Milchzuckerhefen. ebd. **256**, 462 (1932). S.A. — 365) ***Ders.***, Specif. der Glucos. bzw. Galactosidasen etc. in Bakt. ebd. **272**, 133 (1934). S.A. — 366) ***Ders.***, Glykosidasen, insbes. bei Schimmelpilzen und Bakt. Naturwiss., **1934**, 406. S.A. — 367) ***Ders.***, Glykoside und Disacch.-spalt. Enz. von Schimmelpilzen. Bioch. Zs., **273**, 198 (1934). S.A. — 368) ***Ders.***, Emulsin der Hagebutten. ebd. **267**, 309 (1934). S.A. — 369) ***Ders.***, Verschiedene Pflanzen-Emulsine. ebd. **272**, 426 (1934). S.A.

Dieses allgemeine Ergebnis, daß je nach der Provenienz die Verhältnisse der Wirkung auf Glucoside und Galactoside stark wechseln können, ist nun bei Helferich selbst an einem exakt untersuchten Objekt, nämlich dem Emulsin aus den Samen der Luzerne, *Medicago sativa,* von Hill **370)** bestätigt worden. Er fand, daß dieses Enzymgemisch hauptsächlich Mannoside spaltet, ferner beide Galactoside und ein Phenolglykosid des Glucosamins, daß aber die Wirkung auf β-Phenol-glucosid um fast zwei Zehnerpotenzen kleiner ist, so daß man hier vielleicht mit einem Fehlen der Glucosidase im Sinne einer minimalen unspezifischen Wirkung zu rechnen hat.

Jedenfalls ist sie also nur in sehr geringer Menge vorhanden. Es bleibt allerdings auch noch die Annahme, daß es sich doch immer nur um ein Ferment handelt, dessen relative Spezifitäten in den beiden Emulsinen der Mandel und der Luzerne stark gegeneinander verschoben sind, so daß im ersteren beinahe stets ein Verhältnis 1 : 10 (Galactosidase : Glucosidase) gefunden wird, in der Luzerne ein viel größeres im umgekehrten Sinne (60 : 1). Dafür spricht nach Hill, daß auch sonst die beiden Enzyme aus verschiedener Quelle stark verschieden sind, und zwar nur bezgl. der galactosidatischen Wirkung, nicht z. B. der auf Mannoside. So kann man z. B. das Enzym aus Mandel über das Silbersalz reinigen, während es bei Luzerne irreversibel zerstört wird. Auch die ph-Aktiv.-Kurve zeigt bei beiden Enzymen erhebliche Abweichungen; für die β-Galactosidase des Luzernen-Enzyms Opt. ph bei 3,4, bei Mandel 5—6. Endlich ist auch der Verlauf der Kurven bei der Inaktivirung durch Wärme und U.V.-Strahlung bei beiden Galactosidasen verschieden. Hill nimmt also an, daß die Mannosidase dieselbe ist, aber beide Galactosidasen verschieden.

Auf dieser speciellen Wirkung des Emulsins aus Luzerne haben Gootz c.s. **371a)** einen Nachweis von Lactose im Harn aufgebaut, indem sie nach der Spaltung die Monosen bestimmen.

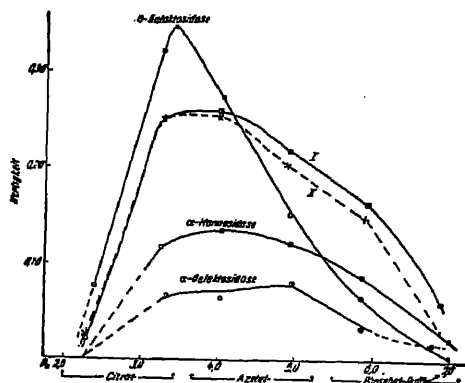



Abb. 23. ph-Aktivitätskurven des Luzerne-Emulsins; und ph-Aktivitätskurve eines Gemisches von 1,0 Teilen Mandel-Emulsin (rein) mit 1,07 Teilen Luzerne-Emulsin, I gemessen, II berechnet. Nach Hill **370)**.

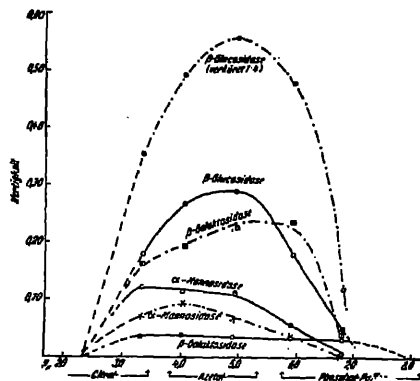



Abb. 24. ph-Aktivitätskurve des Mandelemulsins — Rohferment, . . . Reinferment nach Hill **370)**.

Helferich **371)** hat daraufhin noch eine weitere seltsame Verschiedenheit in der Wirkung der β-Galactosidase zwischen Mandel und Luzerne gefunden. Während bei ersterer die Galactosidase von den Kresol-galactosiden (ebenso wie bei den Glucosiden, § 336) die Ortho-Verbindungen schneller spaltet als die Isomeren, bleibt diese Verschiebung bei der Luzerne aus.

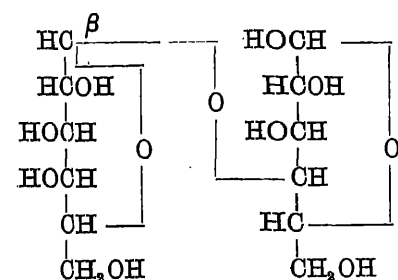
---

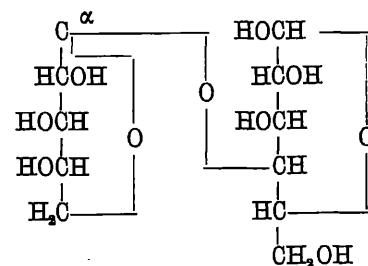
370) ***K. Hill,*** Luzerne- Emulsin. Ber. Sächs. Akad. Wiss., **86,** 115 (1934). S.A. — 371) ***B. Helferich, H. Scheiber,*** Emulsin XV. Zs. phys. Chem., **226,** 272 (1934). S.A. — 371a) ***R. Gootz, H. Tunger,*** Lactosenachweis im Harn. Zs. phys. Chem., **217,** 28 (1934).

Er hält also die beiden Galactosidasen für verschieden und läßt weiterhin nach den bisherigen Befunden die Frage nach der Identität von β-Galactosidasen und β-Glucosidasen offen.

Substrate der β-Galactosidasen. Von natürlichen Substraten kommen in Betracht: **Lactose, Allolactose, Vicianose.**

Die Struktur der Lactose ist ebenfalls lange umstritten gewesen, heute aber sicher erkannt. Nach HAWORTH u. LONG **372)** und ZEMPLÉN **373)** hat sie genau dieselbe Struktur wie Maltose und Cellobiose, nur eben eine Galactose in β-Bindung anstatt der Glucose in 4 an die andere Glucose gebunden. Beide Monosen sind pyroid. Lactose ist also eine 4-β-Galactosido-glucose.

Die von EMIL FISCHER (1902) dargestellte Galactosido-glucose ist nach SCHLUBACH (l. c. 359) sehr wahrscheinlich mit Lactose identisch.

β-Galactose Glucose

I. Lactose

α-l-Arabinose

II. Vicianose.

Eine die Struktur beweisende Synthese liegt noch nicht vor, die von PICTET **374)** aus Galactosan + Glucose ist nicht als solche zu betrachten.

Allolactose: HELFERICH **375/6)** hat eine 6-β-Galactosido-glucose nach derselben Methode dargestellt wie die Melibiose (§ 331, l. c. 256). Diese Biose erwies sich als identisch mit der von POLONOVSKI **377)** in der Frauenmilch aufgefundenen Allolactose, die wohl noch nicht ganz rein erhalten ist. Es kommt also auch das der Melibiose entsprechende 6-Galactosid in der β-Form natürlich vor. Diese Biose ist ebenfalls durch Emulsin spaltbar, wohl sicher durch dieselbe Galactosidase. Hier zeigt sich also mit fast absoluter Sicherheit, daß die Frage, ob der eine Zucker in 4 oder 6 an die Glucose gebunden ist, für die Enzymspaltung keine entscheidende Rolle spielt, was für die Frage der Existenz getrennter Cellobiasen und Gentiobiasen natürlich sehr wichtig ist.

Die **Isolactose** EMIL FISCHER's, die er durch biochemische Synthese erhielt, ist auch heute noch nicht aufgeklärt, ebenso angebliche Spaltungen und Nichtspaltungen bei Isomeren der Lactose (H. W. S. 624).

Über die Spaltung der **Manninotriose** ist seit dem H. W. S. 630 nichts weiter bekannt geworden. Es ist ein Trisaccharid aus 2 Galactose + 1 Glucose, entstanden durch Abspaltung des Fructose-restes aus dem Tetrasaccharid Stachyose. Das Trisaccharid Manninotriose wird wahrscheinlich ganz normal durch die β-Galactosidase zerlegt.

---

372) ***W. N. Haworth, Ch. W. Long,*** Const. of the disacch. XII. Lactose. Jl. of Chem. Soc. **1927, 544.** — 373) ***G. Zemplén,*** Dir. Konst. Ermittl. des Milchzuckers. Ber. Chem. Ges., **59,** 2402 (1926). S.A. — 374) ***A. Pictet, H. Vogel,*** Synth. du lactose. C. R., **185,** 332 (1927); Helv. Ch. A., **11,** 209 (1928). — 375) ***B. Helferich, H. Rauch,*** Zuckersynthesen VI. Ber. Chem. Ges., **59,** 2655 (1926). — 376) ***B. Helferich, G. Sparmberg,*** Kristall. 6-β-d-Galaktosido-glucose. Ber. Chem. Ges., **66,** 806 (1933). — 377) ***M. Polonowski, A. Lespagnol,*** Constit. de l'allo-lactose. C. R., **195,** 465 (1932).

Vicianose ist von HELFERICH 378) als 6-α-l-Arabinosido-glucose (Formel II) synthetisch dargestellt worden. Diese Biose kommt natürlich vor im Glykosid Vicianin in einigen *Vicia*-arten, das Aglucon ist Phenylglykol-cyanhydrin (BERTRAND H. W. S. 610, *l. c. 629*), sowie im Gein (H. W. S. 632). BERTRAND fand auch bereits die Spaltung dieser Biose durch Emulsin und schrieb sie der Amygdalase zu. Dies ist nicht mehr zulässig, da diese Arabinoside konfigurativ der β-Galactose entsprechen. Es wird also die Spaltung zwischen der Glucose und dem Aglucon durch eine „Hetero-glucosidase" bewirkt, wobei wir die Frage der Identität dieses Enzyms mit der allgemeinen β-Glucosidase hier nicht erörtern wollen; die Biose selbst aber durch β-Galactosidase zerlegt. Eine von ZEMPLÉN 373) durch Abbau von Lactose erhaltene 3-β-Galactosido-arabinose ist ebenfalls durch Emulsin spaltbar.

Einfache Derivate der Lactose. Lactobionsäure: die alte Angabe von BIERRY (*l. c. 739*, s. o.), daß weder Emulsin noch tierische Lactase dieses Derivat der freien Glucosegruppe angreifen, sondern nur Extrakt aus *Helix*, ist nicht voll zutreffend. NEUBERG u. HOFMANN 379) fanden Mandelemulsin schwach wirksam (17 % Spaltung), aber Milchzuckerhefen (*Saccharom. fragilis* und *kefyr*) energisch (69 %), so daß BIERRY in der Differenzirung zwar qualitativ, aber nicht quantitativ Recht behält.

Lactosazon wird, ebenfalls im Gegensatz zu BIERRY, von allen Lactasen gespalten (WEIDENHAGEN, l. c. 348, S. 138).

Lactose-carbonsäure wird nach PRATESI (l. c. 278) ebenso gespalten wie Maltosecarbonsäure durch Hefen, nämlich durch Mandel-emulsin (30 %) und *Sacch. fragilis* (40,5 %).

Ureido-lactose zerfällt durch β-Galactosidasen in Glucose-ureid + Galactose (HOFMANN 380)). Lebende Pilze (*Mucor javanicus, Asperg. niger, Sacchar. fragilis*) verbrauchen dann die Galactose und lassen Glucose-ureid übrig. *Aspergillus oryzae* wuchs nicht an.

Synthetische Heteroside. Die Spaltung der einfachen β-Galactoside ist seit EMIL FISCHER bekannt (H. W. S. 624). Synthese einiger β-Galactoside von ROBERTSON 381): Hydrochinon, Anisol, l-Menthol, d-Borneol; keine Angaben über enzymatische Spaltbarkeit.

Über die völlige Parallelität der Galactosid-spaltung und Glucosid-spaltung beim Mandelemulsin nach HELFERICH haben wir bereits berichtet; neuerdings hat HELFERICH 382) noch die Galactoside der verschiedenen Kresole dargestellt. Es zeigt sich auch hier wieder die Parallelität, indem wie bei den Glucosiden das Galactosid des ortho-Kresols viel schneller gespalten wird als die para-Verbindung; und auch hier hört diese Parallelität beim Emulsin der Luzerne auf, das beide Isomere gleich schnell spaltet.

α-l-Arabinoside. Die theoretisch so interessante Spaltbarkeit dieser den β-Galactosiden konfigurativ gleichen Heteroside durch Emulsin hat BRIDEL 383) beim Aethyl-arabinosid aufgefunden, auch hier werden die Phenolglykoside schneller zerlegt (HELFERICH, l. c. 360/1).

Rhamninose, Robinose. Was für ein Ferment diese beiden isomeren Trisaccharide zerlegt, die beide 2 Rhamnose + 1 Galactose enthalten (H. W. S. 635 und CHARAUX 384)), ist völlig unklar. Rhamninose soll überhaupt enzymfest sein; Robinose nur durch ein Spezialferment der Samen von *Robinia*, **Robinase**, gespalten werden. Beide Zucker sind enthalten in den Flavonol-glykosiden Xanthorhamnin in *Rhamnus infectoria*, resp. Robinin in *Robinia pseudacacia*, die durch „Rhamnodiastase" (§ 342; hier vielleicht = β-Galactosidase) zerlegt werden in die Aglucone und die genannten beiden Trisaccharide. Deren Struktur ist im Einzelnen nicht

---

378) ***B. Helferich, H. Bredereck,*** Zuckersynth. VIII. (Vicianose). Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **465**, 166 (1928). — 379) ***C. Neuberg, E. Hofmann,*** Enz. Spalt. der . . . Lactobionsäure. Bioch. Zs., **252**, 434 (1932). — 380) ***E. Hofmann,*** Phys. Verh. der Ureidolactose etc. Bioch. Zs., **253**, 462 (1932). — 381) ***A. Robertson,*** Prepar. of some galactosides, Jl. of Chem. Soc. **1929**, 1820. — 382) ***B. Helferich, H. Scheiber,*** Emulsin XV. Zs. phys. Chem., **226**, 272 (1934). S.A. — 383) ***M. Bridel, C. Béguin,*** Synth. bioch. de l'éthyl-arabin. C. R., **182**, 659, 812; Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 469 (1926). — 384) ***C. Charaux,*** Dédoubl. bioch. du robinoside etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 915 (1926).

bekannt, ebensowenig ob die Galactose in ihnen in α- oder β-Stellung gebunden ist. So kann man sie nur ganz provisorisch hier unterbringen. Über die Glykoside selbst s. § 361.

Über die **Natur des Enzyms** selbst und seine äußeren Wirkungsbedingungen ist so gut wie nichts Neues bekannt geworden.

Die Verschiedenheit des **opt. ph** bei den einzelnen Abarten ist immer wieder bestätigt worden; HOFMANN **385)** hat die Daten tabellarisch zusammengestellt (s. Tab.).

Tabelle der ph-Optima der β-Galactosidasen nach HOFMANN **385)**.

Ferment, hergestellt aus	Art	pH	Autor
Bakterien	B. coli	7,0	H. KARSTRÖM **389)**
„	B. casei ε	6,0	H. KARSTRÖM **389)**
„	Sulfatasebakterien	6,7	E. HOFMANN **365)**
Hefen	Milchzuckerhefen	etwa 7,0	R. WILLSTÄTTER und G. OPPENHEIMER (*l .c. 752*)
Schimmelpilzen	Aspergillus niger	4,7	E. HOFMANN **385)**
„	Aspergillus oryzae	4,3	E. HOFMANN **385)**
Phanerogamen	Rosaceen	4,2 bis 4,6	R. WILLSTÄTTER und W. CZÁNYI (*l. c. 765*)

Hefenlactase = ca 7, Emulsin-galactosidase ca 4,5—5,0. HELFERICH und SCHEIBER **382)** fanden aber im Luzernensamen eine andersartige β-Galactosidase. Sie unterscheidet sich durch den ph, Opt. bei 4,0, und durch ihre Wirkung: sie spaltet die Kresol-β-galactoside gleich schnell, nicht wie die des Mandelemulsins die ortho-Verbindung viel schneller als die para; daß hier also aus diesen und anderen Gründen die scheinbare Identität mit der β-Glucosidase nicht anzunehmen ist, haben wir oben berichtet.

Lactase der Hefen. HOFMANN **386)** konnte durch Behandlung von Bierhefen mit 3 %-iger Milchzuckerlösung eine adaptative Bildung von Lactase erzielen. Nachweis durch Spaltung von Ureido-lactose.

Lactase in *Aspergillus niger* und *oryzae* HOFMANN **387)**. Diese Lactase entspricht insofern der der Hefen, als sie durch Galactose, nicht durch Glucose gehemmt wird, während die Salicinspaltung nicht durch Galactose, stark durch Glucose gehemmt wird. Es ist also auch dadurch β-Galactosidase von β-Glucosidase zu unterscheiden.

Bakterien. Lactase in Pneumokokken **388)** und *B. coli* (**388a)**). *Bact. Delbrücki* enthält nach HOFMANN (l.c. 365) nur β-Galactosidase, keine β-Glucosidase, ebenso ein *B. coli* nach Züchtung auf Lactose oder auf Bierwürze. Bei *B. prodigiosus* fehlten alle Glykosidasen. — In *B. coli* und *casei* ε (KARSTRÖM **389)**); in *Termobacterium mobile* FORSSMAN (l. c. 143).

Tierische Lactase. Über dieses Enzym ist immer noch nichts Genaueres bekannt. Es ist wohl das einzige dieser Gruppe, bei dem die Auffassung ARMSTRONG's von ihrer Natur als „Gluco-lactase" noch eine gewisse Wahrscheinlichkeit hat, jedoch ist diese Frage mangels jeglicher modern-exakten Arbeit garnicht näher zu diskutiren. In dieser

385) ***E. Hofmann,*** Bez. zwischen ph und Abkunft der Carbohydr. Bioch. Zs., **275,** 320 (1935). S.A. — 386) ***Ders.,*** Lactase in untergär. Hefen. Bioch. Zs., **265,** 209 (1933). — 387) ***Ders.,*** Glucos. spalt. Enz. in Schimmelpilzen. Bioch. Zs., **273,** 198 (1934). S.A. — 388) ***W. L. Fleming, J. M. Neill,*** Pneumococcus . . . lactase. Jl. of Exp. Med., **45,** 169 (1927). — 388a) ***L. Löwenstein, W. L. Fleming, J. M. Neill,*** Lactase . . . of the colon bac. Jl. of Exp. Med., **49,** 475 (1929); BPh **54,** 237. — 389) ***H. Karström,*** Laktase der Bakterien. Diss. Helsinki 1930; Acta Ch. Fenn., **5,** 44 (1932).

Beziehung ist man über die Angabe STEPHENSON's (*l. c. 793*) nicht hinausgekommen, daß tierische Lactase garnicht von Galactose gehemmt wird, wohl aber von Glucose.

Diese abweichende Hemmung ist neuerdings von CAJORI **389a)** bestätigt worden. Er fand beim Hund L. in Darm und Leber. Opt. ph = 5,4—6,0. Adsorbirbar als schwache Säure an Al- und Fe-Hydroxyd. Die MICHAELIS-konstante gibt er mit K_3 = 0,006 an.

Was sonst vorliegt, sind einige kasuistische Ergänzungen zu dem bereits bekannten Vorkommen der L. Beim Menschen fand MARX **390)** L. im Stuhl sowohl von Säuglingen wie von Erwachsenen; dagegen fehlt nach KRZYWANEK (l. c. 312) L. in den Faeces der Haustiere, mit Ausnahme ganz junger Ferkel. Bei Kücken fehlt sie im Magen, Darm, Pankreas, ist aber im Kropf vorhanden (HAMILTON **391)**). — Bei Bienen fehlt L. (l. c. 157, 158).

Die Allgegenwart von L. in allen Organen außer Blut behauptet NINNI **392)**. Sein „Nachweis" dieser erstaunlichen Tatsache besteht darin, daß an sich Milch nicht zur Gerinnung bringende Bakterien dies tun, wenn man der Milch ein steril entnommenes Organstückchen zufügt, dessen „Lactase" also den Milchzucker zerlegt, so daß dann die Bakterien eine saure Gärung hervorrufen können, und die Milch gerinnt.

Lactase in der Placenta: MAEDA **393)**, im Fetus KEENE c.s. (l. c. 240), in Ovarialcysten TACHIBANA **394)**. Abbau von Lactose durch Milchdrüse (Kuh) fand SVANBERG **395)**, aber keine biochemische Synthese; vgl. dazu aber § 302. Nach Einspritzung von Lactose tritt nach ABDERHALDEN **396)** Lactase im Blut und Harn auf; dann erscheint auch Saccharase, aber nicht umgekehrt Lactase nach Injektion von Saccharose.

IV. β-Glucosidasen.

§ 333. Allgemeines. Bei der Besprechung dieser sehr wichtigen Fermentgruppe treffen wir auf ganz besondere Schwierigkeiten. Es sind hier nicht blos die ja überall vorhandenen und uns schon vertrauten sachlichen Schwierigkeiten der Bestimmung der Spezifität, sondern hier führen diese weiter zu einer sonst nicht vorhandenen Schwierigkeit in der Disponirung des Kapitels. Wir stehen hier nämlich sachlich und bei der Verteilung des Stoffes vor der Frage, ob wir die Spaltungen der Holoside und Heteroside gemeinsam oder getrennt behandeln sollen. Bei den bisher besprochenen Oligasen war diese Frage leicht zu entscheiden: wir konnten stets auf eine getrennte Besprechung der Heterosidspaltungen verzichten. Denn stets waren die Holoside die einzigen natürlich vorkommenden und auch enzymchemisch die einzig wichtigen Substrate. Wenn auch die Spaltungen oder Nicht-spaltungen der synthetisch hergestellten Heteroside für interne Fragen sich als wichtig erwiesen, so war doch keine Veranlassung gegeben, anders zu disponiren, als daß man diese Wirkungen mit im Hauptkapitel unterbrachte, eben bei Maltasen, Melibiasen, Lactasen.

Bei den β-Glucosidasen liegt die Sache völlig anders. Ihre Definition als Gruppe lautet dahin, daß sie alle Bindungen lösen, die in β-Konfiguration vom C1 einer Glucose ausgehen; dies gilt aber auch dann, wenn diese Glucose am C6 strukturell verändert ist, wenn also z. B. dieses C6 anstelle der primären Alkoholgruppe ein Methyl trägt (Isorhamnoside) oder nur ein H (Xyloside); auch deren Derivate sind nach HELFERICH **397)** durch dieselben Enzyme spaltbar. Andererseits gilt natürlich

389a) ***F. A. Cajori,*** Lactasewirk. der Darmschleimhaut etc. Jl. of biol. chem. **109**, 159 (1935). Ch. Cbl. **1935**, II, 1385. — 390) ***A. V. Marx,*** Lactase im Darm des Erwachs. Arch. Verdau., **33**, 77 (1924); BPh **29**, 136. — 391) ***T. S. Hamilton,*** Occurr. of lactase in the alim. tract of the chicken. Jl. of Agr. Res., **27**, 605 (1924). — 392) ***C. Ninni,*** Pres. di lattasi . . . nelli organi. Pathol., **17**, 73 (1925); BPh **34**, 256. — 393) ***K. Maeda,*** Ferm. in der Plac. Bioch. Zs., **143**, 347 (1924). — 394) ***T. Tachibana,*** Ferm. in ovar. cysts. Jap. Jl. Obst., **12**, 190 (1929). — 395) ***O. Svanberg,*** Enz. Vers. mit Milchdrüsen. Zs. phys. Chem., **188**, 207 (1930). — 396) ***E. Abderhalden, S. Buadze,*** Auftr. von Lactase im Blut etc. Fermentforsch., **13**, 291 (1932). — 397) ***B. Helferich, H. Appel,*** Emulsin VI. Zs. phys. Chem., **205**, 231 (1932). S.A.

auch hier, daß dieselbe Gruppe von Enzymen die Holoside und die Heteroside mit dieser β-Bindung am C1 der Glucose zerlegt.

Für diese Gruppe gibt es dann eine sehr große Reihe natürlicher Substrate; zunächst mindestens 3 Holoside, Cellobiose, Gentiobiose, Primverose, und eine sehr große Zahl von Heterosiden, zum großen Teil mit β-Glucose allein, aber auch mit verschiedenen Biosen oder noch höheren Zuckern, wenn nur die eigentliche Aglucon-bindung an der Glucose haftet. Dann gibt es aber weiterhin Glykoside, bei denen die Aglucon-bindung nicht an der Glucose sitzt, sondern eine β-Glucose biosidisch gebunden ist, so daß die Fermente dieser Gruppe nicht an der Aglucon-bindung, sondern mitten im Zuckeranteil spalten. Wir können vorläufig noch garnicht übersehen, wieviel Einzelfermente bei allen diesen wechselvollen Erscheinungen mitwirken. Von der Beteiligung anderer Zucker wollen wir dabei vorerst absehen und nur die Fälle ins Auge fassen, bei denen nur β-Glucose und die konfigurativ gleiche d-Xylose mitspielen. Dann können wir mit Wahrscheinlichkeit, aber auch noch nicht voller Sicherheit annehmen, daß alle diese Spaltungen einschließlich derer, bei denen eine zweite Glucose in Biosid-bindung vorliegt (die Hetero-gentiobioside vom Amygdalin-typus), durch ein einziges Ferment katalysirt werden. Dieses Enzym hat im Laufe der Zeit verschiedene Namen bekommen. Erst hieß es allgemein „Emulsin", dann Salicinase oder **Prunase**, neuerdings häufig **β-Phenol-glucosidase**. Am besten bezeichnen wir es hier rein systematisirend als **β-Heteroglucosidase**.

Damit hätten wir zwar den wichtigsten Teil der Spaltungen der natürlichen Glykoside abgegrenzt; aber es bleiben dann noch viele zweifelhafte Fragen anders geartete Glykoside und andere Enzyme betreffend. Schon rein äußerlich wäre also eine Einschachtelung der gesamten Glykosidspaltungen in ein Kapitel β-Glucosidasen zur gemeinsamen Behandlung mit Cellobiase und Gentiobiase unzweckmäßig. Um ein eigenes Kapitel „Heterosidasen" kommen wir also rein dispositionell nicht herum.

Aber auch innere Gründe liegen vor, die β-Hetero-glucosidase getrennt zu behandeln. Wir wissen heute noch durchaus nicht sicher, ob und inwieweit die drei Hauptfermente dieser Gruppe: Cellobiase, Gentiobiase (selbst einschließlich der Amygdalase) und Hetero-glucosidase identisch sind. WEIDENHAGEN (§ 300) vertritt zwar auch in diesem Falle seine etwas diktatorische Einheits-theorie, nach seiner Ansicht gibt es überhaupt nur eine einzige β-Glucosidase, und damit ist Alles gesagt. Aber so einfach liegen die Dinge doch nicht. Es spricht sicherlich Vieles dafür, und auch HELFERICH (l. c. 33) neigt sich dieser Ansicht zu; aber es spricht auch Vieles dagegen, Altes und Neues. Früher hat man z. B. die beiden Wirkungen auf die Holoside Gentiobiose und Cellobiose automatisch zwei verschiedenen Fermenten zugeschrieben; heute hegt man dagegen sehr begründete Zweifel, auch wenn man nicht durchaus mit WEIDENHAGEN geht; denn die β-Glucosido-bindung an C1 scheint tatsächlich viel wichtiger zu sein, als die Anheftung der zweiten Glucose in 4 oder in 6. Es wird ja niemandem einfallen, für die Allolactose eine besondere Allolactase zu postuliren, nur weil diese im Unterschied von der Lactose die Galactosido-bindung in 6 anstatt in 4 hat. So wandeln sich die Ansichten ganz von selbst nach einer Vereinheitlichung hin. Und doch spricht auch hier manches gegen diese absolute Vereinheitlichung, ganz abgesehen von dem noch ungelösten Problem innerhalb der Gentiobiasefrage selbst, nämlich der Frage nach dem Verhältnis von Gentiobiase zur „Amygdalase". Dies haben wir §§ 299, 300 eingehend besprochen, hier nur die Haupttatsache, daß echte Hefen die im Amygdalin gebundene Gentiobiose (Amygdalose) angreifen, freie Gentiobiose bisweilen, Cellobiose überhaupt nicht.

Ungefähr ebenso steht die Frage, ob dieselben Fermente nun auch die Heteroglucoside angreifen. Wir werden im Einzelnen noch weitere Belege für und wider die Einheitlichkeit prüfen (§ 336); eine klare Entscheidung ist auch hier noch nicht möglich. Zweifellos zerlegen fast alle Emulsin-präparate auch Cellobiose, aber immer sehr viel schwächer als Salicin u. dgl. Will man also Identität annehmen, so sollte man biologisch betrachtet zu der Überzeugung gelangen, daß diese Fermente eigentlich auf die Heteroside eingestellt sind und nur nebenher mit stark verkleinerter Affinität auch Cellobiose angreifen. Und das wäre sehr sonderbar im Hinblick auf die Tatsache, daß die Spaltung von Cellobiose ein regelmäßiger Stoffwechselvorgang der Samen sein muß. Denn alle Samen enthalten Reserve-cellulosen vom Typus des Lichenins, die regelmäßig eben über Cellobiose abgebaut werden, so daß dafür ein energisch wirkender Fermentapparat anzunehmen ist.

In der Tat scheinen beim Mandel-emulsin wieder besondere Verhältnisse vorzuliegen. In anderen Samen und in Schimmelpilzen ist das Verhalten der beiden Wirkungen ganz anders; hier kann die Salicin-spaltung erheblich zurücktreten gegenüber der der Cellobiose. So fand WEIDENHAGEN selbst **398)**, daß Gerstenmalz Cellobiose schneller spaltet als Salicin, und nach GRASSMANN c.s. (l. c. 421) kann bei Schimmelpilzen bei erhaltener Spaltung von Cellobiose die von Salicin ganz fehlen. Weiter enthalten Hefen fast stets Heteroglucosidase (H. W. S. 615), während sie angeblich Cellobiose garnicht, Gentiobiose nur ausnahmsweise angreifen (§ 335); ebenso können viele Pflanzenfermente die Amygdalose im Amygdalin nicht angreifen, wohl aber Salicin (§ 336).

So sind denn auch hier die sehr interessanten Parallel-bestimmungen HELFERICH's am Mandel-emulsin ebensowenig ausreichend für einen Identitätsbeweis wie bei der Frage Glucosidase-Galactosidase, in der HELFERICH durch eine ganz analoge Entwicklung der Dinge selbst zweifelhaft geworden ist: es kann ebenso gut eine Mischung verschiedener Enzyme vorliegen wie eine erhebliche Verschiebung der relativen Spezifitäten bei Enzymen verschiedener Provenienz. So sei hier aus dem Material von HELFERICH nur angeführt, daß er **(399)** bei 4 verschiedenen Emulsin-präparaten fast die gleichen relativen Wirkungen fand auf Methyl-glucosid, Phenol-glucosid, Cellobiose und Salicin, Cellobiose zu Salicin immer etwa 1 : 10.

Man wird dieses Problem von der anderen Seite her aufrollen müssen, nämlich möglichst reine Präparate von Cellobiase auf Salicin, Phenol-glucosid etc. prüfen müssen. Vorläufig ist die Frage nicht zu entscheiden. Wir werden hier also, ohne eine bestimmte Stellung einzunehmen, aus äußeren Gründen erst die Enzyme behandeln, die mindestens stark betont die Holoside spalten; dann unter dem Haupttitel der Heterosidasen die Gruppe der β-Hetero-glucosidasen, als ob sie eine selbständige Untergruppe der β-Glucosidasen wäre, sowie im Anschluß daran die anderen Heterosidasen.

§ 334. Cellobiase, Gentiobiase, Amygdalase. Diese 3 Fermente müssen zusammen beschrieben werden, denn nach den Vorbemerkungen hat es eine große Wahrscheinlichkeit, daß alle drei ein und dasselbe Ferment mit abweichenden relativen Spezifitäten sind. Die natürlichen Substrate dieser Gruppe sind: Cellobiose, Gentianose, Gentiobiose, diese sowohl im freien Zustande wie in der Agluconbindung an Benzaldehydcyanhydrin im Glykosid Amygdalin (§ 344). Ein weiteres natürliches Substrat ist die

---

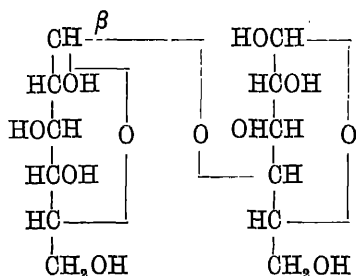
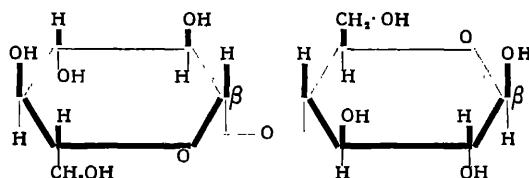
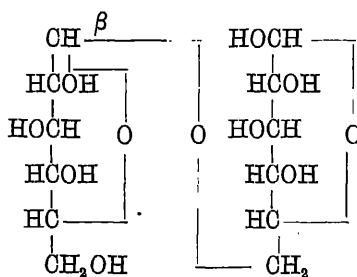
398) ***R. Weidenhagen,*** β-Glucosidase II; Spalt. von Cellobiose. Zs. V. D. Zuck., **80,** 11, (22) (1930). — 399) ***B. Helferich, R. Gootz, G. Sparmberg,*** Emulsin V. Zs. phys. Chem., **205,** 201 (1932). S.A.

Primverose, eine Xylosido-glucose, die in verschiedenen Glykosiden vorkommt, mit der Glucosegruppe gebunden an Salicylsäure-methylester und ähnliche Aglucone, so z. B. im Monotropitosid (H. W. S. 631).

Was für ein Enzym diese Aglucon-bindung in den Primverosiden spaltet, wird uns bei den Heterosidasen beschäftigen; hier interessiert zunächst nur, daß auch Primverose selbst von Emulsin gespalten wird. BRIDEL **400)**, der diese Spaltung aufdeckte, nannte das Enzym zuerst Primverase; er trat aber später selbst für eine Vereinheitlichung ein (§ 337) und jedenfalls erscheint es heute nach den Befunden HELFERICH's nicht mehr nötig, für die Spaltung der Primverose wie der Xyloside überhaupt ein eigenes Enzym anzunehmen.

Es sei noch erwähnt, daß PRINGSHEIM (l. c. 341) es für wahrscheinlich hält, daß die β-Mannobiase des Malzes, welche die β-Mannosido-mannose zerlegt, mit der Cellobiase identisch ist, doch ist dies nicht genügend gestützt und wenig wahrscheinlich (§ 330).

Cellobiose (I, Ia) und Gentiobiose (II) sind beides β-Glucosido-glucosen, unterschieden nur durch die Anheftungsstelle der Glucosido-gruppe in der freien Glucose: Gentiobiose in 6, Cellobiose in 4.

Die Formeln sind von HAWORTH **401)**, **402)** gesichert worden, für Cellobiose ist die allgemeine Strukturidentität mit der Maltose dadurch erwiesen worden, daß sie 2, 3, 5, 6 Tetramethyl-gluconsäure liefert, die Bindung also in 4 sitzen muß. Außerdem hat ZEMPLÉN **403)** Cellobiose direkt bis zur Gluco-erythrose abgebaut.

I. Cellobiose

Ia. Projectionsformel der Cellobiose.

II. Gentiobiose.

Synthesen: Gentiobiose ist zunächst ohne Strukturbeweis erhalten worden; sie entsteht in geringer Menge bei der Darstellung der Isomaltose nach EMIL FISCHER; aber die Angabe BERLIN's, daß sie dabei als Hauptprodukt entsteht, also praktisch mit der Isomaltose identisch ist, ist von PICTET **404)**, **405)** widerlegt worden. Wir kommen darauf unten zurück. Eine strukturbeweisende Synthese von α-Methyl-gentiobiosid und Gentiobiose selbst gelang HELFERICH **406)**.

Die Synthese der Cellobiose selbst macht sehr große Schwierigkeiten wegen der Bindung nach C 4.

---

400) ***M. Bridel***, Prés. dans l'emuls. de deux nouv. f. . ., primevérase. C. R., **181**, 523 (1925). — 401) ***W. Charlton, W. N. Haworth, St. Peat***, Revis. of structural form. of glucose. Jl. of Chem. Soc., **129**, 89 (1926). — 402) ***W. N. Haworth, Ch. W. Long, J. H. Plant***, Const. of disacch. XVI. Cellobiose. Jl. of Chem. Soc. **1927**, 2809. — 403) ***G. Zemplén***, Dir. Konst. Ermittl. der Cellobiose. Ber. Chem. Ges., **59**, 1254 (1926). S.A. — 404) ***A. Pictet, A. Georg***, Nouv. synth. de l'isomalt. etc. C. R., **181**, 1035 (1925). — 405) ***A. Georg, A. Pictet***, Synth. du gentiobiose. Helv. Ch. A., **9**, 444 (1926). S.A. — 406) ***B. Helferich c.s.***, Synth. eines Disacch.-Gluc., Synth. der Gentiobiose. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **447**, 19, 27 (1926).

Sie ist erst kürzlich FREUDENBERG 407) gelungen, aber noch mit sehr schlechter Ausbeute, aus Aceto-brom-glucose + Laevo-glucosan. Indessen war FREUDENBERG 408) schon vorher die immerhin die Struktur beweisende Synthese von Heptamethyl-Cellobiose geglückt.

Primverose ist als 6-β-Xylosido-glucose erkannt und synthetisch hergestellt (HELFERICH 409)); sie hat also die Struktur der Gentiobiose.

Gentianose ist ein Trisaccharid und zwar β-Glucosido-saccharose, Formel § 308. Es wird von Emulsin, also β-Glucosidase, resp. Gentiobiase gespalten in β-Glucose + Saccharose. — Eine **Isosaccharose** synthetischer Darstellung (vgl. § 308) soll nach GEORG 410) ein β-Glucosido-α-fructo-furanosid sein; sie wird weder von reiner Saccharase noch von Emulsin gespalten, nur von Enzym aus *Aspergillus*. Es scheint sich aber doch um eine schwache und nur bei kräftigen Präparaten nachweisbare Wirkung von β-Glucosidase zu handeln.

Sonstige β-Glucosido-glucosen, das Isomaltoseproblem (H. W. S. 583). Die Frage nach der Natur der verschiedenen als „Isomaltose" bezeichneten Biosen ist auch heute noch nicht geklärt. Indessen ist wenigstens das Eine ziemlich sicher, daß es drei verschiedene Biosen gibt, die man gelegentlich so genannt hat. Ob aber auch nur eine von ihnen wirklich ein rein dargestelltes chemisches Individuum ist oder alle nur Mischformen, ist bisher nicht zu entscheiden, und die feinere Struktur bei allen unbekannt. Diese 3 Biosen sind:

1. die **Isomaltose** nach EMIL FISCHER (*l. c. 416*), auf rein chemischem Wege dargestellt durch Kondensation von Glucose. Sie allein ist künftig als Isomaltose zu bezeichnen.
2. Die **Revertose** HILL's, entsteht durch biochemische Synthese aus Glucose durch Mandelemulsin oder Bäckerhefe (PRINGSHEIM) (§ 302).
3. Die **Dextrinose** SYNIEWSKI's entsteht beim Stärkeabbau, und zwar über eine Triose (LING 411)).

Alle drei sind nach GEORG und PICTET 412) verschieden, sie geben für die 3 Biosen folgende Konstanten an:

	Isomaltose	Revertose	Dextrinose
$[\alpha]_D$	+ 98,4°	91,5°	141°
do. des Ozazons	+ 23,1°	0°	ca 55°
F. „ „	160°	174°	153°

Für die Isomaltose haben sie eine neue Synthese ausgearbeitet, nämlich durch Aufspaltung des Di-lävoglucosans von PICTET mit konz. HCl. Dieses soll demnach das Anhydrid der Isomaltose sein, und daraus schließen sie mit Vorbehalt auf eine Struktur der Isomaltose; sie soll 2 Glucosen mit einer 1,6-Sauerstoffbrücke enthalten, die in 1,5 gebunden sind. Jedoch halten sie bei der Instabilität der Biose besonders gegen Oxydation und nach ihrem Verhalten gegen Emulsin (s. u.) auch eine Bildung aus am-Zuckern für möglich.

Einen Versuch von BERLIN 413), diese Isomaltose FISCHER's mit Gentiobiose gleichzusetzen, lehnen sie ab. Die von BERLIN erhaltenen geringen Mengen (2 %) sind nur ein Nebenprodukt der Synthese. Diese bilden sich auch bei der biochemischen Synthese durch Hefen als Nebenprodukt (ISAJEV 414)), nach PRINGSHEIM 415) sogar als Hauptprodukt, was die Ver-

---

407) ***K. Freudenberg, W. Nagai,*** Synth. der Cellobiose. Ber. Chem. Ges., **66,** 27 (1933). — 408) ***K. Freudenberg c.s.,*** Synth. der methyl. Cellobiose. ebd. **63,** 1961 (1930). — 409) ***B. Helferich, H. Rauch,*** Synth. der Primverose. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **455,** 168 (1927). — 410) ***A. Georg,*** Config. de l'Isosacch. etc. Helv. Ch. A., **17,** 1566 (1934). — 411) ***A. R. Ling, D. R. Nanji,*** Nature of polymer. amyloses. Jl. of Chem. Soc., **123,** 2666 (1923); **127,** 629 (1925). — 412) ***A. Georg, A. Pictet,*** Isomaltose. Helv. Ch. A., **9,** 612 (1926). S.A. — 413) ***H. Berlin,*** Ident. of isomaltose with gentiobiose. Jl. Amer. Chem. Soc., **48,** 1107 (1926). — 414) ***V. J. Isajev,*** Isomaltose. Chemick. Listu, **20,** H. 5. S.A. (franz. Résumé). — 415) ***H. Pringsheim, J. Bondi, J. Leibowitz,*** Revers. Synth. II. Gentiobiose und Revertose. Ber. Chem. Ges., **59,** 1983 (1926). S.A.

wirrung noch vermehrt; denn ISAJEV setzt mit BERLIN nun diese Gentiobiose = Isomaltose, während PRINGSHEIM Isomaltose mit Revertose identifiziren will, was wie gesagt nach GEORG und PICTET beides nicht stimmt. Über die Struktur der Revertose und Dextrinose ist somit eigentlich noch garnichts bekannt. Sie werden beide durch Emulsin gespalten. Isomaltose verhält sich sehr sonderbar. Nach GEORG und PICTET **412)** wird sie sehr langsam in Glucose zerlegt, wobei eine intermediäre Erhöhung der opt. Drehung eintritt, während gleichzeitig noch das Osazon der Isomaltose nachweisbar ist, keine Maltose. Es soll ein Zucker als Zwischenstufe entstehen, der dasselbe Osazon gibt wie Isomaltose, aber stärker dreht. Es scheint also immer nur ein Teil der Isomaltose angegriffen zu werden, in dem Maße wie diese Umlagerung in den höher drehenden Zucker erfolgt. Hefen aller Art greifen Isomaltose überhaupt nicht an.

Dieses enzymtypische Verhalten spricht also ebenfalls für die Verschiedenheit von Isomaltose und Revertose, die von PRINGSHEIM c.s. **415)** angezweifelt wird, weil bei ihnen die Konstanten von Revertose und der PICTETschen Isomaltose fast restlos übereinstimmen. Nun wird ja aber Revertose von Bäckerhefe ebenso gespalten wie sie gebildet wird, sie verhält sich also enzymtypisch ganz anders. Davon abgesehen, stimmen sie in bezug auf die Verschiedenheit von Gentiobiose von diesen anderen Biosen überein. Gentiobiose entsteht bei der biochemischen Synthese betont durch Unterhefe, Revertose durch Bäckerhefe, wie letztere auch nur durch Bäckerhefe zerlegt wird.

Ebenso stimmen PRINGSHEIM c.s. darin mit PICTET überein, daß die Dextrinose wieder etwas anderes ist. Diese Biose ist schon vor langer Zeit bei der Stärkespaltung erhalten und immer wieder mit der Isomaltose zusammengeworfen worden. PICTET **416)** hat sie auf einem neuen Wege erhalten, aus einem Iso-trihexosan (§ 371) durch Hydrolyse mit verd. Oxalsäure, oder aus einem davon abgeleiteten Dihexosan (Dextrinosan) durch konz. HCl. Was diese Biose ist, wie sie bei der Stärkespaltung entsteht und was für ein Enzym sie weiter abbaut, ist vollkommen unklar. Es hängt diese Frage mit den ebenfalls völlig ungelösten Problemen der β-Bindungen in der Stärke selbst zusammen, auf die wir § 367 zurückkommen werden. Hierbei taucht noch ein weiteres Problem auf, das der **Amylobiose**, die nach PRINGSHEIM **417)** ebenfalls bei der Stärkespaltung entstehen soll (§ 367), ebenso aber auch aus Hexosanen durch Säurespaltung. Sie soll durch ein Enzym **Amylobiase** zerlegt werden; und dieses Enzym soll nun entweder die β-Amylase selbst (die des Malzes, nicht der tierischen Sekrete und nicht des Mandel-emulsins) sein oder zum mindesten ein wesentlicher Bestandteil dieses Fermentes. Amylobiose soll ferner resistent sein gegen das Enzym Biolase (aus Lupinensamen technisch hergestellt), das Stärke direkt zu Glucose aufspaltet, ebenso gegen *Saccharomyces ludwigii*, der aus Glykogen direkt Glucose bildet. PRINGSHEIM gibt seiner Amylobiose vorläufig die Struktur einer 5-Glucosido-glucose. Die ganze Sache ist rätselhaft; so ist es kein Wunder, wenn KARRER **418)** angibt, daß weder die Amylobiose noch das Enzym Amylobiase existiren, und WEIDENHAGEN **419)** sich ihm anschließt.

Spezifitätsgrenzen der Cellobiase. Die ersten wirklich exakten Untersuchungen an einem hochwertigen und weitgehend gereinigtem Enzym aus Schimmelpilzen verdanken wir GRASSMANN, ZECHMEISTER c.s. **420), 421)**. Es ergab sich, daß Cellobiase neben Cellobiose auch die natürlichen höheren Abbaustufen der Cellulose zerlegt, nämlich Cellotriose, Cello-tetraose und Cello-hexaose. Die ersteren beiden sind gegen Cellulase resistent; erst bei der Hexaose stoßen beide Spezifitäten zusammen; dieses Polysaccharid

---

416) ***A. Pictet, H. Vogel,*** Nouv. sér. de prod. de depolym. de l'amidon. Helv. Ch. A., **12**, 700 (1929). — 417 ***H. Pringsheim c.s.,*** Spezif. der Amylasen. — Amylobiose. Ber. Chem. Ges., **59**, 991, 996, 1001 (1926). S.A. — 418) ***P. Karrer,*** Isolichenin und Stärkeabbau. Zs. phys. Chem., **148**, 62 (1926). — 419) ***R. Weidenhagen, A. Wolf,*** Z. K. der Stärke, Zs. V. D. Zuck. **80**, 264 (1930). — 420) ***W. Grassmann, L. Zechmeister, G. Tóth, R. Stadler,*** Enzym. Abbau der Cell. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **503**, 167 (1933). S.A. — 421) ***W. Grassmann, R. Stadler, R. Bender,*** Specif. cellulosesp. Enz. ebd. **502**, 20 (1933). S.A.

wird von beiden Enzymen gespalten. (In der α-Reihe gilt dies nicht, denn Amylohexaose wird durch Maltase nicht mehr angegriffen, WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 283).

Ein wasserlösliches Cello-dextrin wird ebenfalls angegriffen. Dies gilt für Pilzenzym; Mandel-emulsin greift die höheren Glieder der Reihe wesentlich langsamer an als Cellobiose (Triose dreimal, Dextrin zehnmal langsamer). Salicin wird u. U. vom Pilzenzym bei noch erhaltener schwacher Cellobiasewirkung garnicht mehr angegriffen. Gentiobiose ist leider nicht mit in den Kreis dieser exakten Untersuchungen gezogen worden.

Cellobionsäure wird am besten durch Taka zerlegt (422)); bis 78 %, schwerer durch Emulsin (bis 59 %) und Malzauszug (21 %), trotzdem letzterer Cellobiose bis zu 90 % spaltet. **Cellobiose-carbonsäure** wird nach GRASSMANN 421) durch Ferment aus Schimmelpilzen, nach CATTANEO 423) durch Malz leicht zu 70—90 % gespalten; wenig durch Mandel-emulsin, garnicht durch Taka und Milchzuckerhefen (*Sacchar. fragilis*). Dieser Befund spricht für eine Verschiedenheit von Cellobiase und β-Hetero-glucosidase, sowie Cellobiase und Galactosidase, jedoch ist die Nicht-wirkung von Taka nicht zu erklären.

Eine Spaltung von Gentiobial resp. Hydrogentiobial fand BERGMANN 424), von β-Methyl-cellobiosid durch Schneckenferment KARRER 425). Die Spaltung verläuft am Ende total, aber die der Cellobiose-Bindung schneller, so daß β-Methyl-glucosid als Zwischenprodukt zu fassen ist.

Erwähnt sei noch die Spaltung eines Trihexosans, das beim Abbau der Stärke durch Erhitzen in Glycerol erhalten wurde, durch Mandel-emulsin (PICTET 426)). Es zerfällt in Glucose + Dihexosan. Diese Sache ist ebenso unklar, wie alles was mit diesen Poly-hexosanen resp. den β-Bindungen in der Stärke zusammenhängt. Wir kommen darauf § 367 zurück.

Über die **Fermente selbst** ist noch sehr wenig bekannt. **Gentiobiase** als solche ist noch kaum untersucht; wir können also auch bisher kein Material darüber geben, ob sie als Ferment äußerlich irgendwelche Unterscheidungsmerkmale gegenüber der Cellobiase zeigt; wahrscheinlich sind wie gesagt beide Enzyme identisch, trotz ihres angeblich verschiedenen Vorkommens in verschiedenen Hefen etc. Eine Trennung der **Cellobiase** von Cellulase gelang zuerst PRINGSHEIM 427) insofern, als er aus Gerstenmalz eine rein wirksame Cellulase erhielt und zwar durch Adsorption an Meta-Aluminium-Hydroxyd bei ph = 11. Reine Cellobiase konnte er so nicht erhalten; dies gelang erst GRASSMANN c.s. 420) aus Schimmelpilzen durch dieselbe Adsorption, auch an Bauxit oder Diaspor, und Elution. Dabei erhielten sie cellulasefreie Cellobiase. Das Ferment konnte durch Dialyse gereinigt werden, da diese wenig schädigt.

Der **opt. ph** ist für Cellobiase aus Malz nach PRINGSHEIM 4,9—5,3, für *Aspergillus* ca. 6, GRASSMANN gibt aber auch hier 4,5 an.

Einheit der Cellobiase diejenige Enzymmenge, die 0,1 Millimol Cellobiose (34,2 mg) bei ph = 4,5 und 30° in 2 h zu 25 % spaltet (l. c. 420/1).

Amygdalase und Gentiobiase. Zu der offenen Frage, ob Cellobiase und Gentiobiase völlig identisch sind, gesellt sich nun die sonderbare und noch nicht befriedigend zu deutende Differenzirung zwischen Gentiobiase schlechthin und der Amygdalase der Hefen und des Emulsins. Die Doppelbenennung hat historische Gründe. Man wußte längst, daß im Glykosid Amygdalin an das Aglucon eine Biose gebunden ist, die man

---

422) ***Cl. Antoniani***, Enzym. Spalt. der Cellobionsäure. Bioch. Zs., **273**, 219 (1934). — 423) ***C. Cattaneo***, Enzym. Spalt. der Cellobiose-carbons. ebd. **272**, 430 (1934). — 424) ***M. Bergmann, W. Freudenberg***, Gentiobial etc. Ber. Chem. Ges. **62**, 2783 (1929). — 425) ***P. Karrer, M. Tschan***, Abbau von β-Methylcellobiosid. Helv. Ch. A., **9**, 680 (1926). — 426) ***A. Pictet, R. Salzmann***, Trihexosane. Helv. Ch, A., **7**, 934 (1924). — 427) ***H. Pringsheim, A. Beiser***, Trenn. der Ferm. des Gerstenmalzes. Bioch. Zs., **172**, 411 (1926).

Amygdalose nannte, die aber nicht rein dargestellt war, und deren Struktur man nicht kannte. Man hielt sie sogar lange für eine α-Glucosido-glucose, da diese Biose, solange sie in der Agluconbindung steht, durch Hefen-enzyme gespalten wird. Man unterschied deshalb im Komplex des „Emulsins" nunmehr mehrere Enzyme. Zuerst spaltet ein Enzym die Biose noch im Verband mit dem Aglucon, wie seit EMIL FISCHER bekannt, und läßt die eine Glucose in der Bindung an das Aglucon zurück; und dann erst spaltet ein anderes Enzym die Bindung zwischen Aglucon und Glucose. Das erstere Enzym nannte man nun Amygdalase. Das andere, die Aglucon-bindung zerlegende, stets als β-Ferment bekannte, nannte man Amygdalinase, später nach ARMSTRONG Prunase, es entspricht nunmehr unserer Hetero-glucosidase. Die Amygdalase rechnete man wie gesagt zu den α-Fermenten.

Als sich nun aber (vgl. H. W. S. 585) herausstellte, daß die gebundene Biose Amygdalose nichts anderes ist als Gentiobiose, da stand man vor der auch heute noch nicht befriedigend geklärten Tatsache, daß Hefen in den allermeisten Fällen (es gibt einige Ausnahmen, s. § 335) die freie Gentiobiose nicht angreifen, sondern eben nur die im Glykosid gebundene „Amygdalose". Man mußte also zunächst annehmen, daß Gentiobiase und Amygdalase verschiedene Enzymtypen sind.

Genau dasselbe gilt im übrigen für Gentianose, bei der eine an der freien Glucose eingetretene Fructose die Stelle des Aglucons vertritt. Auch dieses Trisaccharid wird von (natürlich saccharasefreien) Hefenenzymen nicht in Glucose + Saccharose gespalten, ebenso wenig β-Methyl-gentiobiosid; alle diese Derivate mit einer Substitution an der freien Glucose werden nur von Emulsin zerlegt. Nur grade die Kombination, wie sie im Amygdalin vorliegt, wird auch von Hefen angegriffen.

Eine Erklärung steht aus. Den Versuch von LEIBOWITZ, diese Differenzirung auf zwei verschiedene Typen von Gentiobiase in derselben Art zurückzuführen, wie es zwei Typen von Maltase gibt, haben wir § 299 ausführlich besprochen.

Er will die Gentiobiase als solche als „Glucosido-gentiobiase" auffassen, die Amygdalase als „Gluco-gentiobiase" gerät aber dadurch in Schwierigkeiten: man kann es auch beinahe umgekehrt deuten. Die Sache ist bisher überhaupt nicht aufzuklären. Vermutlich sind beide Typen völlig identisch und die häufige Nicht-spaltung freier Gentiobiose durch Hefen-enzyme hat ganz andere Ursachen, die wir noch nicht kennen. Wir werden gleich sehen, daß sich auch andere Biosen im freien Zustande enzymtypisch sehr sonderbar verhalten können.

Spaltung anderer heterosidisch gebundener Biosen. An die Sachlage beim Amygdalin wird man nämlich erinnert, wenn man einige andere Spaltungen von Biosen in Agluconbindung betrachtet. Wir werden die Einzelheiten darüber erst wegen der sonstigen Zusammenhänge bei den Heterosidasen (§§ 337, 342a, 361) geben, obgleich die Dinge eigentlich hierher gehörten; denn der Hauptzug, daß eben freie Biosen sich enzymtypisch ganz anders verhalten als in Bindung an Aglucone, zeigt sich auch bei diesen Reaktionen. Aber die Fragen der mitwirkenden Fermente sind hier noch zu wenig geklärt, so daß wir diese Fälle nicht aus dem Zusammenhang reißen können.

Wir deuten also hier nur voraus, daß wir dort mehrfach folgenden Sachverhalt finden werden: an ein Aglucon ist eine Biose gekettet, aber nicht mit der Glucose, sondern mit einem anderen Zucker, der seinerseits erst wieder in β-Bindung mit einer Glucose verkettet ist. Dieser Zucker am Aglucon kann je nachdem l-Rhamnose sein oder Digitoxose, Cymarose u. a. Es erfolgt nun eine enzymatische Spaltung des Glykosids (angeblich nicht durch die allgemeine β-Glucosidase, sondern durch spezifische Spezialenzyme) derart, daß stets nur eine Trennung innerhalb der Biose eintritt: es wird also eine Glucose abgespalten und es verbleibt das Aglucon in Bindung an den Rest, so daß sich sekundäre Glykoside ausbilden, die als Zucker

Abgeschlossen: 10. 9. 35. Ber. Phys. 87, H. 1/2.

die oben genannten enthalten, so z. B. Frangulosid, Scillaridin A., Digitoxin, Cymarin u. a., und diese sind nunmehr überhaupt nicht enzymatisch spaltbar. Nun kommt aber das Sonderbare: hydrolysirt man vorsichtig mit Säuren, so kann man die Biosen als solche vom Aglucon ablösen und erhält sie frei. So sind bekannt Scillabiose, Digilanidobiose, Strophantobiose (bei *Frangula* ist sie noch nicht isolirt). Und diese freien Biosen sind nun gegen die β-Glucosidase wiederum resistent und sogar überhaupt nicht durch Enzyme spaltbar. Während also irgend eine β-Glucosidase die Glucose aus dem Komplex herauszulösen im stande ist, solange die Aglucon-bindung noch existirt, ist dasselbe Enzym völlig wirkungslos, wenn die Glucose nunmehr in der freien Biose nur noch holosidisch gebunden ist. Es ist also genau dieselbe Sachlage wie bei der Frage Gentiobiase-Amygdalase; auch hier Nicht-wirkung der Amygdalase auf die isolirte Biose. Nur fehlt in diesen anderen Fällen bisher das der Gentiobiase entsprechende Ferment mit Wirkung auf die freie Biose ganz. Wahrscheinlich sind sie doch in der lebenden Zelle vorhanden, denn anscheinend werden auch diese sekundären Glykoside gespalten; aber da keine diesbzgl. Holosidasen bisher bekannt sind, können wir sie hier nicht schildern. Eine Erklärung für diese Erscheinungen kann man noch nicht geben. Am ehesten könnte man vermuten, daß die gebundenen Biosen doch eine etwas andere Struktur haben, als isolirt in freiem Zustande, jedoch ist dafür ein Anhaltspunkt auch noch nicht vorhanden.

§ 335. Vorkommen von Cellobiase und Gentiobiase. Mit Ausnahme einiger weniger ganz moderner Arbeiten herrscht auf diesem Gebiete eine sehr unerfreuliche Verwirrung. Grade diese Unklarheiten und Widersprüche sind zum größten Teile daran schuld, daß auch die Spezifitätsfragen bei diesen Fermenten nicht zur Ruhe kommen. Um nur ein Beispiel zu nennen: der ganze Streit um die Identität der Gentiobiase und der Amygdalase hat daher seinen Ursprung genommen, daß Hefen Gentiobiose nicht angreifen. Nun gilt dies aber nach einer Priv. Mitt. von Rich. Kuhn nicht unbedingt; es gibt auch Hefen mit Gentiobiase-wirkung. In der Literatur ist darüber aber überhaupt nichts zu finden, mit Ausnahme einer alten Arbeit von Bourquelot (*l. c. 425*). Andererseits findet man nur Angaben, daß Cellobiase in allen Hefen fehlt; kommt nun Gentiobiase tatsächlich vor, Cellobiase aber wirklich nicht; so wäre dies ein Beweis für die Verschiedenheit beider Fermente, die wir aus anderen Gründen für unwahrscheinlich halten. Wenn weiter Cellobiase immer und Gentiobiase meist in Hefen fehlt, so ist vollkommen rätselhaft, was für ein β-Ferment die Holosid-synthese zur Revertose in den Hefen vollzieht, außer wenn es eben die Amygdalase ist, die sich beinahe in allen Hefen findet (H. W. S. 586) und eben doch wahrscheinlich einfach Gentiobiase ist. Allerdings ist nun wieder Revertose nicht Gentiobiose. Andererseits wäre wieder der wirkliche Nachweis, daß die β-Holosidasen tatsächlich in Hefen meist fehlen, sehr wichtig für die Frage der Identität mit der β-Hetero-glucosidase, denn diese, gekennzeichnet durch Spaltung von Amygdalin am Aglucon, kommt in Hefen recht häufig, vielleicht regelmäßig vor (H. W. S. 615).

In Wirklichkeit sind wahrscheinlich alle diese Unklarheiten nur durch mangelhafte Kenntnisse bedingt. Wahrscheinlich enthalten die Hefen immer oder meist beide Holosidasen, die eben identisch sind, aber wohl nur in geringer Menge und vielleicht durch Hemmungen verdunkelt. Zum Teil mag dies daran liegen, daß man zu viel an intakten Hefezellen gearbeitet hat; diese geben bisweilen ganz falsche Bilder, weil die hier in Frage stehenden Biosen ganz andere Permeabilitäts-bedingungen haben als Saccharose und Maltose. Man darf also künftig nur auf Ergebnisse an isolirten Fermenten Wert legen. Eine Wiederaufnahme dieser Untersuchungen wäre von erheblicher prinzipieller Bedeutung. Bisher liegen einige Ansätze dazu von Neuberg u. Hofmann **428)**

428) ***C. Neuberg, E. Hofmann***, β-Glucosidase, Bioch. Zs. **256**, 450 (1932). S.A.

vor. Sie haben Milchzuckerhefen als Objekt gewählt, weil diese wegen des Fehlens von Saccharase und Maltase, sowie Melibiase etwas einfachere Verhältnisse darbieten.

Ihre Ergebnisse sind sehr interessant. Es zeigte sich, daß sich lebende Hefen gegen Cellobiose ganz verschieden verhalten; dagegen ließen sich Enzyme isoliren, die regelmäßig Cellobiose angreifen, wie auch β-Methyl-glucosid und Salicin. Dieses Enzym oder diese Enzyme ließen sich mit der Lactase zusammen isoliren und zwar aus *Sacchar. fragilis, Sacchar. kefyr* und einer dritten Hefe Sp. 102. Das Enzym hat einen höheren opt. ph als die β-Glucosidase des Emulsins (6,0) und wird durch Glucose gehemmt (**429**). Eine mit Milchzuckerlösung vorbehandelte Bierhefe spaltet zwar Amygdalin reduzirend, enthält also Amygdalase, spaltet aber nicht Salicin; hier fehlt also die β-Heteroglucosidase, die wie erwähnt sehr häufig in Hefen gefunden wird (Hofmann, l. c. 386).

Bei **Schimmelpilzen** sind von jeher sämtliche in Betracht kommenden Fermente nachgewiesen. Reindarstellung der Cellobiase neben Cellulase Grassmann c.s. (l. c. 420/1); weitere Untersuchung der Glucosidasen Hofmann (l. c. 367).

Bakterien: *B. coli* und *B. delbrücki* enthalten überhaupt keine β-Glucosidase, ebensowenig *Termobacterium mobile* (*Pseudomonas Lindneri*), dessen Enzym weder β-Methylglucosid, noch Salicin und Amygdalin angreift (Forssman, l. c. 143). Ein „Sulfatase-bakterium" genanntes, das Chondroitin-schwefelsäure abbaut, enthält dagegen alle Oligasen, darunter auch Cellobiase (Hofmann **430**)).

Samen: Wo Cellulase (Lichenase) vorkommt, findet sich natürlich auch Cellobiase. Partielle Trennung beider Fermente im Malzextrakt Pringsheim (l. c. 427); Wichtig für die Identitätsfragen der Befund Weidenhagen's, daß Malzextrakt Cellobiose schneller spaltet als Salicin. Abgesehen davon ist die Wirkung der echten „Emulsine" aus Rosaceensamen auf Cellobiose sehr schwach, auf Gentiobiose sehr selten geprüft, daher die Unklarheit über die Identität der beiden Holosidasen und ihr Verhältnis zur Heteroglucosidase.

Bei **Tieren** kommen diese β-Glucosidasen nicht vor. Ein Befund von Cellobiosespaltung im Inhalt des Pansens beruht auf mit der Nahrung eingeführter Cellobiase; die Schleimhaut enthält sie nicht (Antoniani **431**)).

---

429) ***E. Hofmann,*** β-Glykosidase der Milchzuckerhefen. ebd. **265,** 462 (1932). S.A. — 430) ***E. Hofmann,*** Vork. von Glucosidasen etc. in Bakt. Bioch. Zs., **272,** 133 (1934). S.A. — 431) ***Cl. Antoniani,*** Cellobiase des Rinderpansens. Bioch. Ter. Sper., **22,** 48 (1935); Chem. Cbl. **1935,** I, 3679.

C. Heterosidasen.

I. Allgemeines.

§ 336. **Heterosidasen** sind nach der Definition alle Enzyme, welche in den natürlichen und synthetischen Heterosiden die Bindung zwischen dem Zucker und dem Aglucon lösen. Wie aus den allgemeinen Erörterungen und besonders aus § 333 hervorgeht, ist die Abgrenzung dieser Enzyme eine ziemlich willkürliche und zweifelhafte Schematisirung, mehr aus Gründen einer übersichtlichen Disposition als aus inneren Gründen vorgenommen. In Wirklichkeit konnten wir diese Schematisirung bei allen anderen Holoside spaltenden Fermenten als den β-Glucosidasen von vornherein nicht durchführen, haben uns vielmehr der inneren Logik der Sachlage folgend auf den Standpunkt gestellt, daß die Spaltung der Heteroside der Zucker denselben Enzymen zuzuschreiben ist, die auch die Holoside derselben Zucker spalten. Wir können hier tatsächlich mit Sicherheit annehmen, daß hier immer nur jeweilig ein Enzym existirt, spezifisch nur nach dem in Glykosidbindung stehenden Zucker, sowie der Konfiguration dieser Bindung. Es ist hier aber auch eine rein dispositionelle Abgrenzung von Heterosidasen garnicht nötig, weil Heteroside dieser Zucker nicht natürlich vorkommen, oder sehr spärlich. α-Glucoside scheint es überhaupt nicht zu geben*), und ob es einige natürliche Galactoside gibt, ist bisher nicht sicher festzustellen (§ 361). Wo es andererseits natürliche Heteroside mit anderen Zuckern gibt, so mit Rhamnose, Digitoxose etc., gelten sie einerseits bisher als überhaupt enzymfest; und wenn es dazu passende Fermente gibt, so spielen sie wieder bei den Holosiden keine Rolle, so daß auch hier keine Wirrnisse entstehen.

Die einzige große Schwierigkeit treffen wir vielmehr an bei den β-Glucosidasen. Hier finden wir eine große Anzahl natürlicher Hetero-glucoside, die in der Art enzymatisch spaltbar sind, daß eben Glucose vom Aglucon abgelöst wird. Die dazu gehörigen Fermente sind also jedenfalls zunächst einmal β-Glucosidasen. Wir wollen als feststehend annehmen, daß alle diese Hetero-glucoside durch ein einziges Enzym gespalten werden, eben eine **Heteroglucosidase**. Dann aber entsteht hier, und nur hier, die zweite Frage, ob dies nun dasselbe Ferment ist, das die β-Holoside der Glucose spaltet, ob es also mit einer β-Glucosidase schlechthin identisch ist. Wir haben diese Frage § 333 diskutirt und sind zu dem Ergebnis gelangt, daß sie nicht zu entscheiden ist, so lange noch die Identität der Holosidasen selbst, nämlich Cellobiase, Gentiobiase und Amygdalase in Zweifel gehüllt ist. Wir haben also die Frage offen gelassen und uns entschlossen, jedenfalls aus Gründen der übersichtlicheren Disposition die β-Heteroglucosidasen als eine besondere Gruppe der β-Glucosidasen im Rahmen der Heterosidasen überhaupt zu behandeln.

Was die Frage anlangt, ob diese Heteroglucosidase identisch ist mit der Holosidase Cellobiase-Gentiobiase, so haben wir § 333 einiges von dem spärlichen Material angegeben. Es zeigte sich, daß beim Mandel-emulsin die Sachlage eher für Identität spricht, da hier stets einer stärkeren Salicin-spaltung eine geringere und um dasselbe Maß geringere Cellobiose-spaltung entspricht; daß aber in anderen Fällen die Relationen ganz anders sein können, so daß etwa

*) Ein α-Glucosid haben angeblich Tauber und Kleiner (Jl. of biol. Chem. **105**, XCI, 1934) in *Solanum indicum* gefunden, aber ohne nähere Angaben.

beim Malzextrakt die Salicinspaltung zurücktritt (l. c. 398) oder bei Schimmelpilzen ganz fehlen kann (l. c. 421). Zu diesen dort gegebenen Daten kommt nun noch ein weiterer bisher nicht genügend geklärter Umstand bei den Glykosidspaltungen. Wieder ist hier die ungeklärte Natur der Amygdalase der Hemmschuh einer Aufhellung der Verhältnisse. Denn wiederum finden sich hier Beobachtungen, die auf den ersten Blick darauf deuten, daß die Amygdalase ein ganz anderes Enzym sein sollte als die Heteroglucosidase. Wie erwähnt greifen alle Hefen die gebundene Gentiobiose im Amygdalin, die Amygdalose, in der Weise an, daß sie zunächst nur eine Glucose abspalten und ein Mono-glucosid des Aglucons zurücklassen, das EMIL FISCHER als Mandelnitril-glucosid bezeichnet hat, dem dann später ARMSTRONG den Namen Prunasin gegeben hat. Dieses Glucosid wird ebenfalls von den meisten Hefen, wenn auch langsam, gespalten. ARMSTRONG schrieb aber diese beiden Spaltungen verschiedenen Enzymen zu und nannte das Prunasin spaltende Ferment „**Prunase**"; es entspricht also unserer β-Hetero-glucosidase. Dazu bewog ihn die Beobachtung, daß es zahlreiche Pflanzenextrakte gibt, die zwar Salicin und ähnliche einfache Monoglucoside spalten, ebenso auch das Prunasin, die aber Amygdalin nicht angreifen, weil ihnen die Amygdalase fehlt und die Belastung mit der zweiten Glucose die Affinität zur Glucose-Aglucon-bindung herabsetzt oder aufhebt (H. W. S. 589, 591/3, ARMSTRONG, *l. c. 443, 449*). Würden diese Beobachtungen der gegebenen Spaltung der Hetero-glucoside bei Fehlen der Spaltung von Gentiobiose mit modernen Mitteln einwandfrei bestätigt, so könnte man kaum noch an der Verschiedenheit zweifeln, denn bei einer Gleichsetzung von Holosidase und Heterosidase wären diese Befunde nicht zu erklären; diese Bestätigung steht aber leider noch aus *). Ist aber die Heterosidase ein eigenes Ferment, so wären diese Beobachtungen sehr wohl zu deuten. Die Nicht-spaltung von Amygdalin wäre ebenso wie die gleich zu schildernde Nicht-spaltung anderer Hetero-bioside dadurch zu erklären, daß bei Fehlen der Amygdalase, also Ausfall der primären Zerlegung der Biose, die relative Affinität der Hetero-glucosidase zur Bindung Glucose-Aglucon eben durch die Belastung der Glucose mit einer zweiten Glucose stark gemindert oder aufgehoben würde **). Dasselbe ist der Fall, wenn an die Glucose sich nicht eine zweite bindet, sondern eine Xylose, nämlich in den Heterosiden der Primverose, oder eine l-Rhamnose. Nur dann, wenn das Hindernis der Belastung durch eine angreifende Holosidase beseitigt wird, kann die Hetero-glucosidase wirksam angreifen (um absolute Unspaltbarkeit handelt es sich nicht, wie die Zahlen von ARMSTRONG (*l. c. 449*) zeigen); sobald es sich also um ein einfaches Hetero-glucosid handelt. Diese Befreiung der Glucose von dem Anhang geschieht wohl zweifellos immer durch die gleiche Holosidase, ob es sich um Gentiobiose oder Primverose handelt (§ 333), und das Gleiche dürfen wir wahrscheinlich auch für andere Biose-Spaltungen annehmen, wenn auch vorläufig noch Manches dagegen spricht.

Wenn wir diese Verschiedenheit annehmen, so hätten wir drei verschiedene Typen von Präparaten, die diese beiden Enzyme in verschiedenen Relationen und verschiedener Wirkung enthalten. Das eine Präparat ist das klassische Emulsin, d. h. die Extrakte der Samen von Rosaceen und vielen anderen Pflanzen. Hier finden wir beide Fermente in bestimmten Relationen, die eine starke Spaltung sowohl von Amygdalin wie von Mono-glucosiden verbürgen. Gerstenmalz und Schimmelpilze enthalten betont oder praktisch ausschließlich die Holosidase, Salicinspaltung tritt zurück oder fehlt. Andere Pflanzen-extrakte, z. B. nach ARMSTRONG Blätter von *Prunus* und *Laurus*, ferner auch *Salix*, enthalten vorwiegend Prunase, die Amygdalinspaltung tritt in den Hintergrund. So könnte es sein, wenn man die Verschiedenheit als erwiesen annimmt. Dazu reicht aber das Material nicht aus. Ich halte es für wahrscheinlich, daß die „Prunase" ein eigenes Ferment ist, erwiesen ist es nicht.

*) Anm. Diese Versuche sind unvollkommen, in der Hauptsache nur HCN-Abspaltung verglichen für Amygdalin und Prunasin, ohne ph-Messung. Die Nichtspaltung von Amygdalin könnte vorgetäuscht sein.

**) Aehnlich scheint es beim Lusitanicosid (l. c. 47) zu sein, jedoch ist hier die Biose noch nicht aufgeklärt.

Eine praktische Konsequenz hat aber diese Sachlage. Man darf „Emulsin" künftig nur die Präparate nennen, die diesem Typus der Rosaceensamen entsprechen. Es ist nicht mehr zulässig, von einem „Emulsin der Schimmelpilze" oder dergl. zu reden, denn wie auch die Sache sich verhalten mag, jedenfalls haben diese Präparate einen anderen Wirkungstypus, und es muss zu gedanklichen Verwirrungen führen, wenn man den einen Typus deckenden Namen Emulsin auch für solche ganz abweichenden Präparate anwendet. Wo es sich nicht um Präparate handelt, sondern um die darin enthaltenen Fermente, soll man den Namen Emulsin überhaupt vermeiden und von Heteroglucosidase sprechen oder von Prunase.

§ 337. Andere Heterosidasen. Zu dieser Hauptfrage, ob die Hetero-glucosidase etwa des klassischen Emulsins mit einer allgemeinen β-Glucosidase identisch ist, treten nun aber noch weitere Fragen nach der Existenz anderer spezifischer Enzyme für gewisse besondere Glykosidspaltungen. Und zwar Fragen doppelter Art. Erstens, ob es Spezialenzyme für besondere Aglucon-bindungen gibt. Ist diese Aglucon-bindung an Glucose geheftet, so dürfen wir wohl mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit annehmen, daß nur ein Enzym in Frage steht, trotz einiger noch vorhandener Unklarheiten, auf die wir §§ 342, 342a zurückkommen. Es gibt aber auch andere Zucker an der Agluconbindung, und somit taucht die Frage auf, was für Enzyme hier am Werke sind; die Antwort auf diese Frage wird dadurch noch fast unmöglich, weil für die meisten dieser Aglucon-bindungen, z. B. an Rhamnose, eine Spaltbarkeit experimentell nicht festgestellt werden konnte. Es sind seit jeher eine große Anzahl von Glykosiden bekannt, die von Emulsin nicht angegriffen werden, und es werden immer neue Fälle angegeben, in denen man zwar Unwirksamkeit von Emulsin annimmt, aber Spaltung durch Spezialenzyme der betr. Pflanze selbst, die noch sehr wenig bekannt sind. Die Wirkung ist meist sehr schwach und wie gesagt häufig experimentell im Präparaten garnicht aufzufinden. Das will nun an sich sehr wenig besagen; dieser Mißerfolg im Versuch kann die verschiedensten Ursachen haben, so Zerstörung des Enzyms bei der Aufarbeitung, oder nicht gelungene Freilegung von Desmo-enzymen u. dgl. Daß in der lebenden Pflanze sehr energische Fermentwirkungen ablaufen, die man übersehen hatte, zeigen die exakten Untersuchungen mit modernen Mitteln. Es sind mehrere Fälle bekannt, wo man bei der Aufarbeitung des pflanzlichen Materiales bisher überhaupt nicht die genuinen Glykoside in die Hand bekam, weil sie bereits durch überlebende Fermente z. T. aufgespalten waren. Dies gilt z. B. für die Glykoside aus Rinden von *Rhamnus*, ferner der *Digitalis*, von *Strophantus* u. ä. (§§ 342, 342a), bei denen erst die modernste Experimentirkunst es erreicht hat, die genuinen Glykoside darzustellen, indem man diese Fermente auszuschalten lernte. Dabei zeigte es sich, daß diese nicht an der Aglucon-bindung ansetzen, sondern an Holosid-bindungen innerhalb der Biosen in diesen Glykosiden. Bisher hält man diese Fermente für z. T. neue und spezifische; es ist möglich, daß dies so ist, weil in diesen Biosen mit Glucose Zucker ganz anderer Konfiguration zu Biosen verkettet sind; wir haben darauf § 334 kurz hingewiesen, da diese Enzyme ja eigentlich zu den Holosidasen gehören; wir werden aber des Zusammenhanges wegen erst bei den Glykosidspaltungen § 342a darauf genauer eingehen. Ob hier wirklich spezifische Holosidasen vorliegen, ist noch nicht zu entscheiden. Bei der Spaltung der l-Rhamnosido-glucose in den Rinden von *Rhamnus* z. B. scheint es sich um ganz normale Prunase zu handeln, da hier auch Mandel-emulsin wirkt (§ 342, l. c. 77).

Daß es tatsächlich unspaltbare Glykoside gibt, ist bei der wahrscheinlichen Rolle dieser Stoffe als Reserven für Zucker eigentlich nicht anzunehmen, aber darüber zu urteilen gehört nicht zu unserer Kompetenz, solange keinerlei verwertbares Material

dazu vorliegt. Daß die Nicht-spaltung durch Emulsin kein solches Material ist, braucht nicht wiederholt zu werden, denn es können ja wirklich Spezialenzyme tätig sein, die man noch nicht isolirt hat. Was uns allein hier zu beschäftigen hat, ist Folgendes: es werden immer wieder Fälle von neuen Glykosiden und ihren enzymatischen Spaltungen aufgedeckt und zu den bereits bekannten hinzugefügt, bei denen nicht ganz klar und einfach das Schema der Wirkung der Hetero-glucosidase angewendet werden kann; wir stehen somit immer wieder vor der Frage, ob neue Enzyme anzunehmen sind, und weiterhin vor der Aufgabe, das ganze Gebiet der Heterosidasen nach Möglichkeit zu ordnen. Die Entwicklung dieser Frage geht immer denselben Gang. Einerseits werden immer neue Glykoside und neue Fermente dazu angegeben, und andererseits schreitet die Vereinheitlichung unter den näher bekannten immer weiter vor, indem man immer wieder bei besserer Erkenntnis zu der Überzeugung gelangt, daß hier die gewöhnliche Hetero-glucosidase vorliegt. Diese Entwicklung konnten wir bereits im H. W. § 341 verfolgen: In der Hetero-glucosidase oder Prunase sind aufgegangen z. B. Salicase, Arbutase, Aesculase. Ein weiterer wichtiger Schritt war die Einreihung der inzwischen neu aufgestellten „Rhamnodiastase" (s. u.). Wir können annehmen, daß es in den wenigen Fällen, wo man bei Glucosiden noch Spezialenzyme annimmt (H. W. S. 631), z. B. bei Ruberythrinsäure (§ 342), auch so kommen wird. Dagegen sind wieder eine Menge neuer Begriffe aufgetaucht; Spezialenzyme bei den Glykosiden der *Scilla*, der *Digitalis*, den Anthranol-glykosiden, den Glucuroniden etc. Wir werden bei der Einzelbesprechung sehen, wie weit man da schon Ordnung schaffen kann.

Wir wollen zu diesem Zweck noch einmal ganz kurz auf die Grundlagen zurückgehen. Außer der β-Glucosidase sind nach den Studien an Heterosiden mit Sicherheit als selbständige Enzyme anzusehen: α-Mannosidase und α-Galactosidase. Noch nicht unbedingt gesichert ist die Sonderexistenz der β-Galactosidase, indessen scheint HELFERICH nunmehr auch zur Anerkennung ihrer Eigennatur zu neigen. In das Wirkungsbereich der β-Galactosidase gehören nun aber auch die α-l-Arabinoside. Dies ist hier von Wichtigkeit, weil es natürliche Glykoside gibt, in denen α-l-Arabinose vorkommt, und zwar biosidisch gebunden an Glucose als Vicianose (H. W. S. 587). In diesen Heterosiden ist aber die Glucose an das Aglucon gebunden. Die Lösung der biosidischen Bindung vollzieht hier zweifellos die β-Galactosidase des Emulsins; es bleibt dann ein Mono-glucosid übrig, das nun ebenso zweifellos durch die gewöhnliche Hetero-glucosidase zerlegt wird. Es gibt also weder eine „Vicianase", noch eine „Vicianosidase"; die Spaltungen der Vicianoside gehören ganz einfach zum Bereich der Hetero-glucosidase. Dies gilt wie immer in diesen Fällen bis zum Beweise des Gegenteils: wir können theoretisch die Möglichkeit nicht ausschließen, daß doch der Eintritt einer Arabinose in die am Aglucon haftende Glucose die Affinität so ändert, daß nicht mehr die normale Hetero-glucosidase wirkt, sondern nur ein Spezialenzym. Bisher spricht dafür nichts, und so nehmen wir eben vorläufig Identität an. Dieselben Erwägungen werden wir nun in jedem Falle anzustellen haben, wenn es sich um die Annahme oder Ablehnung besonderer Spezialfermente dreht.

Dafür ist nun ein besonders charakteristischer Fall der der **Rhamnodiastase** (Sammelreferat von BRAECKE 1)). Dieses angebliche Spezialenzym ist erst in neuerer Zeit von BRIDEL postulirt worden; es sollte specifisch sein für die Lösung der Agluconbindung in einigen Biose-glykosiden; dann hat er aber selbst diese Sonderheit aufgegeben

1) ***M. Braecke,*** Rhamnodiastase. Jl. de Pharm. de Belg. **1930**. Nr. 42. S.A.

und das Enzym wieder in die einheitliche Hetero-glucosidase eingereiht. Der Fall ist so typisch, daß wir ihn näher schildern müssen.

Der Name „Rhamnodiastase" ist in doppelter Hinsicht unzweckmäßig gewählt. Erstens kommt darin wieder zum Ausdruck, daß die französischen Autoren als einzige daran festhalten, das Wort „Diastase" als Gesamtbezeichnung für „Enzym" zu benutzen, während sonst der internationale Brauch diesen Namen nur noch für Präparate der Amylasen benutzt; und zweitens läßt der Name annehmen, daß es sich um die Spaltung von Rhamnosiden an der Aglucon-bindung handeln könnte, während er in Wirklichkeit von dem Vorkommen dieses Enzyms in Arten von *Rhamnus* hergeleitet ist, und die Spaltung an einer Glucosido- oder (vielleicht) Galactosidobindung erfolgt.

Die angenommene Sonderstellung dieses Enzyms geht auf Befunde von Bridel **2)** zurück. In Arten von *Primula* finden sich Glykoside mit Primverose als Zucker (H. W. S. 631). Im Gegensatz zu den älteren Angaben zeigte Bridel, daß Mandelemulsin sowohl die Biose an sich zerlegt (in Glucose + Xylose), wie auch die Aglucon-bindung. Er nahm daraufhin zwei neue Fermente an, Primverase und Primverosidase, die auch andere neu entdeckte Primveroside spalten, so das Monotropitosid aus *Monotropa* etc. (§ 342).

Ungefähr gleichzeitig untersuchten Bridel u. Charaux **3)**, **3a)** ein Enzym aus den Samen von *Rhamnus*-Arten, das verschiedene Glykoside spaltet. Dieses Ferment war unter den Namen „Rhamninase" sehr unvollkommen untersucht worden (H. W. S. 635); Bridel schlug nun für das die Aglucon-bindung spaltende Ferment den neuen Namen Rhamnodiastase vor; Rhamninase soll für das bisher nicht aufgefundene Ferment reservirt bleiben, das Rhamninose spaltet (§ 332). Das Enzym spaltet einige Flavonol-glykoside, nämlich Xanthorhamnin aus *Rhamnus infectoria* (Gelbbeeren), Robinin aus *Robinia* und Rutin aus *Ruta* und *Sophora*, die als Aglucone Rhamnetin (Methyl-quercetin) resp. Quercetin (ein Tetra-oxy-flavonol) enthalten. Die Frage nach den Zuckern war noch nicht ganz klargestellt; jedenfalls fand sich Rhamnose gebunden und zwar in Form der isomeren Trisaccharide Rhamninose und Robinose (§ 332) und eines Disaccharids Rutinose (Charaux **4)**). Es erwies sich nun, daß dies dasselbe Ferment ist, das die Primveroside spaltet, so daß der Name Rhamnodiastase beide Enzyme vereinigte; damit war indirekt wahrscheinlich gemacht, daß die genannten Zucker der Xylosido-glucose analog gebaute Rhamnosido-glucosen resp. Rhamnosido-galactosen sind. Dabei ist aber zu beachten, daß eine Analogie in der Konfiguration nur zwischen d-Glucose, d-Xylose und d-Isorhamnose besteht, während die natürlich vorkommende l-Rhamnose anders konfigurirt ist (Näh. und Formeln § 361). Dieses Enzym Rhamnodiastase sollte nun nach Bridel **3)**, **3a)** spezifisch für diese genannten Gruppen von Glykosiden sein, nicht auf die üblichen Mono-glucoside wirken, die durch Mandel-emulsin zerlegt werden. Diese Gruppe der durch Rhamnodiastase spaltbaren Enzyme wurde dann durch Bridel c.s. systematisch ausgebaut (§ 342).

Diese Abtrennung einer eigenen Enzymgruppe Rhamnodiastase stand von vornherein auf schwachen Füßen. Schon als Bridel noch an seine auch davon unabhängige Primverosidase glaubte, fand er selbst, daß Mandelemulsin, wenn auch langsam, das Primverosid Monotropitosid spaltet. Blieb also nur der umgekehrte Beweisgrund, daß Rhamnodiastase die üblichen Mono-glucoside nicht spaltet, ein Beweis, der immer sehr schwer schlüssig zu führen ist, und tatsächlich fand Bridel selbst **5)**, daß diese Spaltung erfolgt, wenn auch langsam. Er hat sogar grade durch Anwendung von Rhamnodiastase ein neues Glykosid aufgefunden, das ein einfaches

---

2) ***M. Bridel,*** Prés. dans l'émuls. . . . de deux nouv. f. etc. C. R., **181,** 523 (1925); Bull. Soc. Chim. Biol., **8,** 67 (1926). — 3) ***Ders., C. Charaux,*** Prod. ferm. . . . de div. Rhamnus etc. C. R., 181, 925 (1925); Bull. Soc. Chim. Biol., **8,** 35 (1926) (Lit.). — 3a) ***Dies.,*** Rech., dans les végétaux, des gluc. hydrol. par la rhamnodiastase. C. R., **181,** 1167; Bull. Soc. Chim. Biol., **8,** 40 (1926). — 4) ***C. Charaux,*** Déd. bioch. de la rutine. Bull. Soc. Chim. Biol. **6,** 631 (1924). — 5) ***M. Bridel, C. Béguin,*** Appl. de la méth. bioch. etc. C. R., **182,** 157; Bull. Soc. Chim. Biol. **8,** 136 (1926).

Mono-glucosid ist, das Polydatosid aus *Polygonum cuspidatum*; wenn hier „Rhamnodiastase" wirkt, so kann man sicher sein, daß es die gewöhnliche Heteroglucosidase ist. Dies gilt überall, soweit es sich um Glucose an der Aglucosebindung handelt. Bei einigen ist dies aber nicht der Fall, da die Glykoside garkeine Glucose enthalten; hier scheint die β-Galactosidase zu wirken, darauf werden wir § 342 zurückkommen.

In der Tat kam kurz darauf BRIDEL 6) in einer zusammenfassenden kritischen Untersuchung zu dem Ergebnis, daß Rhamnodiastase kein besonderes Enzym ist, sondern identisch mit der Hetero-glucosidase. Sie ist nur eine Abart davon, gekennzeichnet durch eine betonte relative Spezifität zu den komplexeren Glykosiden, vergleichbar dem Paar Saccharase-Raffinase. Damit ist die Frage einer völlig isolirten Rhamnodiastase aus der Welt geschafft; was übrig bleibt, ist das uns ja vertraute Problem der relativen Spezifität, mit anderen Worten, warum ein Ferment in verschiedenen Abarten existirt, die sich in verschiedenen Präparaten verschieden verhalten und bei nahe verwandten Substraten bald das eine, bald das andere bevorzugen, ein Problem, dessen grundsätzliche Lösung man noch nicht geben kann.

Von anderen besonders benannten Heterosidasen wird man wohl auch die **Gease** streichen können (H. W. S. 632). Gein oder Geosid, ein Glykosid aus *Geum urbanum*, enthält neben Eugenol als Aglucon (HÉRISSEY 7), 8)) als Zucker die Vicianose, die oben erwähnte l-α-Arabinosido-glucose. Es soll nun die Gease aus der Pflanze selbst nur die Aglucon-bindung zerlegen, nicht die Biose. Das ist aber kein zureichender Grund, um der Gease eine besondere Natur zuzuschreiben, denn Vicianose wird ja von β-Galactosidase zerlegt. Es genügt also anzunehmen, daß das betr. Enzympräparat nur wenig Galactosidase enthalt, wohl aber die normale Hetero-glucosidase. Direkte Prüfungen von „Gease"-präparaten auf Galactosidase liegen nicht vor. Andererseits ist auch beim Emulsin die Wirkung der Galactosidase immer nur schwach; so bleibt auch bei der Spaltung des cyanogenen Glykosids Vicianin (§ 346) durch Emulsin die Vicianose ganz oder teilweise erhalten. Ebenso ist wohl auch das **Indimulsin** (H. W. S. 631) zu streichen, denn sein Substrat Indican ist ein ganz einfaches Mono-glucosid.

§ 338—340. Vorkommen von β-Heteroglucosidase in höheren Pflanzen. Nach diesen Vorbemerkungen über die Vereinigung einer Reihe von früher als selbständig angenommenen Enzymen zu einer einheitlichen, wenn auch wohl gewisse relative Specifitäten zeigenden β-Heteroglucosidase kann man auch alle Angaben über das Vorkommen zusammenfassen, soweit es sich eben mit genügender Wahrscheinlichkeit um dieses Enzym handelt. Einige Angaben über Vorkommen scheinbar specifischer anderer Enzyme werden wir freilich noch — gleichzeitig mit deren Wirkung — nachtragen müssen.

Das reine Aufsuchen von „Emulsin" hatte bereits im Wesentlichen seinen Abschluß gefunden, als die Zusammenstellung im H. W. S. 590 ff. gegeben werden konnte; auf diesem engeren Gebiete ist nur weniges, z. B. über das Vorkommen von „Rhamnodiastase" nachzutragen, die man suchte, solange sie als vom „Emulsin" verschieden galt. Sonst ist die Forschung im Allgemeinen nur noch den Weg gegangen, entweder neue β-Glucoside zu suchen, und dabei meist automatisch auch das dazugehörige Enzym in der Pflanze selbst festzustellen; oder aber Emulsinpräparate mit verschieden nuancirter Wirkung zu suchen, um die Specifitätsfragen zu fördern, besonders die Frage, ob β-Galactosidase mit β-Glucosidase identisch ist. Dem letzteren Zwecke dienten allermeist Prüfungen an den Enzymgemischen von Krypto-

6) ***M. Bridel***, Reflex. sur les diast. et leur spécif. ebd. **8**, 170 (1926). — 7) ***H. Hérissey, J. Cheymol***, Géine etc. C. R., **180**, 384; **183**, 1307; Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 499; **9**, 99 (1925/7). — 8) ***Dies.***, Sucres fournis par la géine etc. C. R., **181**, 565; Bull. Soc. Chim. Biol. **8**, 50 (1926).

gamen: Milchzuckerhefen, Schimmelpilzen, Bakterien, die wir bereits bei den betr. Abschnitten citirt haben (§§ 300, 332, 336); aber auch die Unterschiede zwischen verschiedenen Samen haben wertvolle Aufschlüsse ergeben, so gegenüber den Rosaceen-Samen die von Gerste und Luzerne.

Bei höheren Pflanzen fand z. B. HOFMANN **9), 10)**, daß das Emulsin von *Rosa canina* (Hagebutte) im Gegensatz zum klassischen Mandelemulsin unverhältnismäßig viel β-Galactosidase neben sehr wenig Glucosidase enthält. Während Mandelemulsin etwa 10 mal so stark auf Phenolglucosid wirkt als auf Galactosid, spaltet *Rosa*-Enzym Phenolgalactosid zu 70 %, Phenolglucosid nur zu 3 %, ebenso Mandarinenkerne (*Citrus nobilis*); praktisch garkeine Glucosidspaltung bei Sojabohnen. Auch die Samen der Luzerne, *Medicago sativa*, enthalten nach HILL **10a)** sehr wenig β-Glucosidase neben reichlich β-Galactosidase und Mannosidase. (Näh. § 332).

Primverosidase, später **Rhamnodiastase** genannt, fand BRIDEL **11)** in *Betula lenta* („Betulase"), *Gaultheria procumbens* („Gaultherase"), *Monotropa hypopitys, Primula-Arten, Cornus sanguinea L.*, in Samen von *Rhamnus*-Arten (neben *Rh. infectoria* auch *Rh. frangula, cathartica, utilis*), in Rinden von anderen *Rhamnus*.

Emulsin in *Robinia pseudacacia* (BREESE JONES **12)**), an Protein gebunden, und zwar an Globulin. Emulsine (Salicinwirkung) in Blättern mit etwas verschiedenem opt. ph (*Populus, Salix, Gossypium*) **(13)**; ph bei *Populus* um ca 0,3 niedriger als bei *Salix*.

Blausäure in Pflanzen. Das früher viel geübte bloße Aufsuchen von HCN in allerlei Pflanzen (H. W. S. 594) hat heute seinen Sinn insofern verloren, als man wohl allgemein annimmt, daß größere Mengen HCN, die analytisch nachweisbar sind, immer irgendwelchen cyanogenen Glykosiden zuzumessen sind. Aber auch deren Erforschung scheint sehr an Interesse eingebüßt zu haben, denn sonderbarerweise sind diese Glykoside seit dem H. W. so gut wie garnicht bearbeitet worden, ich finde auch keine Angaben über neue cyanogene Glykoside (§ 346). Das Aufsuchen von HCN hat heute vielmehr fast nur noch den Zweck, es als einfachste Methode zum Nachweis an sich bekannter Glykoside in bestimmten Teilen der Pflanze und zu bestimmten Zeiten zu benutzen, also rein physiologischen Zwecken zu dienen, auf die wir § 347 kurz eingehen werden.

So seien hier nur einige neuere Arbeiten erwähnt. GUÉRIN **14)** hat das Auftreten von HCN bei verschiedenen Leguminosen untersucht. Bei *Vicia*-arten HCN im Samen (als Vicianin, § 346), 350—750 mg je Kilo. Bei der Keimung bleibt das Glykosid in den Cotyledonen, verschwindet dort langsam; die junge Pflanze ist frei von HCN, bis die neuen Samen gebildet werden. Die Samenschale ist frei von HCN. Bei *Lotus* erscheint das Glykosid (Lotusin) erst bei der Keimung in den Samen, ist aber dafür in der ganzen Pflanze verbreitet. Ebenfalls erst bei der Keimung HCN in den Samen bei *Tetragonolobus, Dorycnium, Bonjeania*, kein Übergang in die Pflanze. *Phaseolus lunatus* (Linamarin), *Trifolium repens, Ornithopus* führen überall HCN. GUÉRIN **14a)** fand weiterhin HCN auch bei der Gruppe *Festucaceae* der Gramineen, und zwar bei *Melica* und *Gynerium argentatum*; IHILLET **15)** in dieser Gruppe auch bei *Molinia caerulea Mönch.* Die bekannte Giftigkeit dieser Pflanze (nur die Blütenstände vor der Befruchtung) beruht also nicht wie man annahm auf einem parasitischen Pilz *Claviceps microcephala Tal.*

---

9) ***E. Hofmann,*** Emulsin der Hagebutten. Bioch. Zs. **267,** 309 (1933). S.A. — 10) ***Ders.,*** Verschied. Pflanzenemulsine. ebd. **272,** 426 (1934). S.A. — 10a) ***K. Hill,*** Luzerne-Emulsin. Ber. Sächs. Akad. Wiss. 86, 115 (1934). S.A. — 11) ***M. Bridel,*** Primvérose etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **7,** 925 (1925). — 12) ***D. Breese-Jones c.s.,*** Proteins of the bark of Rob. pseudac. Jl. of Biol. Chem., **64,** 655 (1925). — 13) ***A. V. Blagoveschenski, N. J. Sossjedov,*** Spec. cond. of act. of leaf salicinase. Biochem. Jl., **21,** 1206 (1927). — 14) ***P. Guérin,*** Ac. cyanh. chez les vesces. C. R., **190,** 512 (1930). — 14a) ***Ders.,*** Ac. cyanh. chez les gramin., Melica et Gynerium. ebd. **198,** 383 (1934). — 15) ***A. Jhillet, R. Zitti,*** Molinia caerul. . . . à ac. cyanh. ebd. **199,** 617 (1934).

II. Die β-Glucoside und ihre Spaltungen.

1) Die einfachen Glucoside.

a) Natürliche Glucoside.

§ 341. Durch Emulsin spaltbare Glykoside. Nach diesen allgemeinen Auseinandersetzungen wollen wir uns nun rein dispositionell auf den Standpunkt stellen, daß erstens die hier aufzuführenden β-Glucoside durch ein besonderes Enzym, eine β-Heteroglucosidase oder Prunase zerlegt werden, und zweitens, daß alle diese Glykoside, bei denen Glucose an das Aglucon gebunden ist, durch dieses eine und dasselbe Enzym gespalten werden, auch dann, wenn diese Glucose nicht isolirt steht, sondern ihrerseits noch mit anderen Zuckern biosidisch verknüpft ist. Diese weitere Gruppe kann eine zweite Glucose sein, oder eine konfigurativ entsprechende d-Xylose in den Primverosiden, oder eine l-α-Arabinose in den Vicianosiden, oder andere Zuckergruppen, worüber noch wenig bekannt ist. Welche Veränderungen an der in Aglucon-bindung stehenden Glucose noch grade zulässig sind, um die Spaltbarkeit zu erhalten, darauf werden wir § 343 zurückkomen; denn diese Frage ist natürlich experimentell an synthetischen einfacheren Heterosiden geprüft worden, bei denen man beliebige Variationen vornehmen kann.

Populin. Der einzige Fall, in dem eine einfach substituirte Glucose in einem natürlichen Glykosid vorkommt, ist der des Populins, eines Glykosids aus Arten von *Populus*. Es ist lange als Benzoyl-salicin bekannt, jedoch glaubte man früher, daß die Benzoylgruppe am Aglucon, dem Saligenin sitzt. Indessen zeigte Kitasato **16)**, daß die Benzoylgruppe dem entgegen am Zucker sitzt, und Richtmyer **17)** konnte die Struktur völlig aufklären. Es ist danach Populin eine 6-Benzoyl-glucose an Saligenin gekuppelt.

Er konnte durch Methylirung und Abspaltung der Benzoylgruppe 2, 3, 4-Trimethyl-glucose identifiziren. Populin wird sehr leicht und fast vollständig durch Taka-enzym gespalten, wobei Benzoylglucose + Saligenin entstehen (Kitasato **16)**), dabei zerfällt auch ein Teil der Benzoylglucose, so daß freie Benzoesäure auftritt. Die alte Streitfrage, ob Mandel-emulsin Populin angreift, oder ob es in der Taka eine besondere **Populase** gibt, ist damit immer noch nicht exakt geklärt; es ist einer der vielen Fälle, in denen Mandel-emulsin irgend ein Glykosid nicht spalten soll, das Schimmelpilze angreifen. Zu einer Charakterisirung eines Sonderenzyms reicht dies hier wie sonst nicht aus, und exaktes Material liegt nicht vor.

Solche Fälle, in denen angeblich „Emulsin" nicht wirkt, sondern nur andere Spezialfermente, tauchen immer wieder auf; einige haben wir schon im H. W. als erledigt betrachten können, andere, bei denen immerhin noch Zweifel bestehen, werden wir am Schluß dieses Abschnittes zusammenstellen, darunter den erst neuerdings zur Sprache gekommenen des Steviosids (l. c. 98). Im übrigen werden wir uns damit begnügen, die natürlichen spaltbaren Glykoside *) in zwei Gruppen getrennt aufzuführen: erst in

---

*) Sammelreferat von M. Braecke **18)**. Bzgl. der Benennung werde ich bei den von den französischen Forschern neu beschriebenen Glykosiden nur deren Benennung geben, also mit der Endung „—osid", sonst beide, und bei den sozusagen klassischen Glykosiden wie Salicin nur den bisher gebräuchlichen Namen.

16) ***T. Kitasato,*** Part. Hydrol. des Populins etc. Bioch. Zs., **190,** 109 (1927). — 17) ***N. K. Richtmyer, E. H. Yeakel,*** Struct. of populin. Jl. Amer. Chem. Soc., **56,** 2495 (1934). — 18) ***M. Braecke,*** Dédoubl. et synth. ferm. des glucos. Ann. et Bull. Soc. Roy. des Sci. Méd. et Nat. de Brux. **1925,** 164.

alphabetischer Reihenfolge die einfachen Glucoside, dann die durch Rhamnodiastase spaltbaren, bei denen zwar das wirksame Enzym das gleiche ist, die sich aber von komplexen Zuckern wie Xylosido-glucosen und Rhamnosido-glucosen ableiten.

Zuvor sei ein natürliches Vorkommen von β-Methyl-glucosid erwähnt, das von WATTIEZ 19) in verschiedenen Dipsaceen neben Scabiosin (s. u.) gefunden wurde, so in *Scabiosa, Dipsacus, Knautia.*

Ferner sei noch wie im H. W. die engere Gruppe um das Salicin herum vorangestellt. Hier ist einiges nachzutragen, da in einigen Arten von *Betula* und *Salix* neue chemisch verwandte Glucoside gefunden worden sind, oder neue Angaben darüber vorliegen.

Salinigrosid (Salinigrin) (H. W. S. 600). Sein Aglucon ist nicht meta-Oxybenzaldehyd, wie sein Entdecker JOWETT zuerst angenommen hatte, sondern p-Oxy-acetophenon, es ist somit identisch mit Piceosid (Picein) (s. u.) (BRIDEL, l. c. 55, JOWETT 20)). Es findet sich in *Salix discolor, nigra, cinerea.* Ebenso ist das aus *Salix cinerea* gewonnene zuerst als besonderes Glykosid Salicinerein benannte mit Piceosid identisch (RABATÉ 21)), ebenso das Ameliarosid (RABATÉ, l. c. 30).

Betulosid (SOSA 22)) in *Betula alba;* Aglucon Betuligenol ist ein Phenol mit einer zweiten alkoholischen OH-Gruppe.

Salidrosid (BRIDEL 23)) in *Salix triandra* (die kein Salicin enthält). Aglucon unbekannt, intensiver Rosengeruch. Salipurposid neben Salicin aus *Salix purpurea* (CHARAUX 24)). Aglucon Salipurpol ist ein Dehydro-phlorizin $C_{15}H_{12}O_5$ *). Es wirkt glykosurisch. Daneben ein Iso-salipurposid, das ein Flavanol, wohl Naringenin enthält.

Salireposid fand WATTIEZ 25) neben Salicin in *Salix repens.* Steht anscheinend dem Populin nahe. Durch Emulsin entsteht neben Glucose Benzoesäure und ein Phenol, das reduzirt. Durch BaOH läßt sich die Benzoesäure allein abspalten; es bleibt dann ein einfaches Heterosid übrig, das durch Emulsin ein Phenol $C_7H_7O_3$, wahrscheinlich mit einer Ketongruppe liefert.

Alphabetische Liste weiterer Glucoside.

Aesculin: Neue Befunde über Verteilung in *Aesculum hippocastanum L.* und biologische Bedeutung von KLEIN c.s. 26); vgl. a. § 346.

Hauptmenge in Rinde und Knospenschuppen, manchmal auch im Mark. Ferner in Fruchtschalen und Wurzeln, wenig in Holz, Blättern, Samen. Struktur und Synthese: nach HEAD u. ROBERTSON 27) ist Aesculin 6-Glucosido-7-oxycumarin, bestätigt von MERZ 28). Das Verhältnis zum isomeren Cichoriin ist ebenfalls geklärt: beide haben in Bindung an Glucose das gleiche Aglucon Aesculetin = 6,7-Dioxy-cumarin, aber der Zucker steht bei Aesculin in 6, bei Cichoriin in 7. Beide synthetisch hergestellt.

---

*) Anm. bei der Rev. In einer soeben erschienenen Mitt. gibt RABATÉ 24a) an, daß der Name Salipurpol zu streichen ist; das Aglucon ist mit Naringetol (Naringenin) aus Naringin von *Citrus decumana* identisch. Naringin selbst ist unspaltbar, enthält Glucosido-rhamnose.

19) ***N. Wattiez,*** Etude bioch. des dipsacées. Bull. Soc. Chim. Soc., **7**, 917; **8**, 501 (1925/6); Bull. Ac. Méd. Belge (5), **10**, 392 (1930); BPh **58**, 412. — 20) ***H. A. D. Jowett,*** Compos. of salinigrin. Jl. of Chem. Soc. **1932**, 721. — 21) ***J. Rabaté,*** Salicinéréine etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **12**, 965 (1930). — 22) ***A. Sosa,*** Héteroside nouveau de Betula etc. C. R., **196**, 1827 (1933); Rev. Ac. Ci. exact. Madrid, **31**, 81 (1934) (Span.); BPh **82**, 392. — 23) ***M. Bridel, C. Béguin,*** Compos. du Salix triandra. C. R., **183**, 231; Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 901 (1926). — 24) ***C. Charaux, J. Rabaté,*** Et. bioch. du genre Salix. C. R., **192**, 1478 (1931); **196**, 816 (1933); Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 588 (1931). — 24a) ***J. Rabaté,*** Bez. des Salipurposids zum Naringosid. Bull. Soc. Chim. Biol. **17**, 314 (1935); Ch. Cbl. **1935**, II, 1895. — 25) ***N. Wattiez,*** Saliréposide etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 658 (1931); Bull. Acad. Méd. Belge (V), **12**, 433 (1932); BPh **70**, 38. — 26) ***G. Klein, H. Linser,*** Verteil. etc. des Aesculin etc. Planta, **15**, 767 (1932); BPh **67**, 270. — 27) ***F. S. Head, A. Robertson,*** Constit. of aesculin. Jl. of Chem. Soc. **1930**, 2434. — 28) ***K. W. Merz,*** Cichoriin und Konst. des Aesculins. Arch. der Pharmac. **270**, 476 (1932).

Ameliarosid, von BRIDEL 29) aus *Amelianchier vulgaris Mönch.* dargestellt, ist nach RABATÉ 30) identisch mit Picein (Piceosid).

Arbutin in zahlreichen Pflanzen; neu gefunden in *Orobus* (*Lathyrus*) *niger* von MEUNIER 31), nicht bei *Orobus tuberosus* (s. u.). Weitere Vorkommnisse: *Arctostaphylos, Chimaphila, Vaccinium, Pirola, Pirus communis, Grevillea robusta, Hakea laurina.* Wegen des bei der Spaltung freiwerdenden Hydrochinons wichtiges Chromogen; Ursache der Schwärzung der Blätter z. B. beim Birnbaum (*Pirus*).

Asebotosid (Asebotin) (H. W. S. 598) ist nach BRIDEL 32) mit Phlorizin identisch. Vorkommen neben *Andromeda* auch in *Kalmia latifolia* (*Ericaceae*).

Asperulosid aus *Asperula odorata* (HÉRISSEY 33)), dem Aucubin sehr ähnlich, Aglucon ebenfalls ein Chromogen. Kommt auch in *Galium verum* und *aparine L.* vor, neben weiteren ähnlichen Glykosiden, ebenso in anderen Rubiaceen, auch in *Coprosma baueriana Hook* (34).

Aucubin ist ein weit verbreitetes Glykosid mit bisher unbekanntem Aglucon, das ein Chromogen ist. Die Liste seines Vorkommens ist ergänzt worden von BRAECKE 35), die es in verschiedenen Scrofulariaceen auffand (*Rhinanthus, Euphrasia, Bartsia, Odontites, Pentstemon Hartwigi*); später (35a) auch in *Alecterolophus minor Wimm. et Grab.* BRIDEL 36) fand es auch in *Lathraea* (*Orobanchaceae*), dagegen enthält *Orobanche* selbst ein anscheinend unspaltbares Glykosid Orobanchin (§ 361). Die bisher falsche Formel des Aucubins ist von M. BERGMANN 37) richtig gestellt worden; sie ist $C_{15}H_{24}O_{10}$ als Minimalformel, die vielleicht mit 2 oder 3 zu vervielfachen ist.

Baillonia spicata H.Bn enthält ein Glykosid mit dem Aglucon Baillonigenol, das ein Lacton ist (38).

In den Blättern und Rhizomen von *Bergenia cordifolia A.Br.* (*Saxifragaceae*) fand BRAECKE 39) ein spaltbares Glucosid, dessen bisher nicht näher bekanntes Aglucon sich nach der Freisetzung oxydirt und somit für die Schwarzfärbung verantwortlich ist. Seine Beziehungen zu dem phenolischen Bestandteil der nahe verwandten *B. crassifolia* (*Saxifraga crassifolia*), die den Gerbstoff *Badan* liefert, sind noch nicht aufgeklärt. Dieses Phenol ist nach TSCHITSCHIBABIN c.s. 39a) ein 4,6 Dioxy-5-Methoxy-isocumarin mit einer Tetrose-Seitenkette in 1.

Buddleia variabilis Hemsl. (*Loganiaceae*) enthält ein unspaltbares Flavonol-glucosid mit Rhamnose + Glucose und einem Aglucon Buddleo-flavonol $C_{18}H_{14}O_6$, und ein spaltbares noch nicht näher bekanntes Glykosid. Endlich noch ein drittes wieder unspaltbares, das anstelle des Zuckers eine Uronsäure enthalten soll, gebunden an ein Homologes des Brenzkatechins (Yü 40)) (§ 362).

Cichoriin aus Blüten von *Cichorium intybus* ist nach MERZ (l. c. 28) dem Aesculin stellungsisomer. Spaltbarkeit leider nicht untersucht. Der 6-Methyl-äther des Cichoriins ist das in vielen

---

29) ***M. Bridel, C. Charaux, J. Rabaté,*** Améliaroside. C. R., **187**, 56; Bull. Soc. Chim. Biol., **10**, 1111 (1928). — 30) ***J. Rabaté,*** Constit. de l'améliaroside. Bull. Soc. Chim. Biol., **12**, 146; Jl. de Pharmac. (8), **11**, 260 (1930). — 31) ***A. Meunier,*** Var. de color. des plantes etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 72 (1931). — 32) ***M. Bridel, A. Kramer,*** Asébotoside. C.R., **193**, 748 (1931); Bull. Soc. Chim. Biol. **15**, 531 (1933). — 33) ***H. Hérissey,*** Aspéruloside etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 1009; **8**, 489 (1925/6); C. R., **180**, 1695 (1925); **182**, 865; **184**, 1674 (1926). — 34) ***Ders.,*** Aspéruloside du Coprosma etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 793 (1933). — 35) ***M. Braecke,*** Prés. d'un glucos.... dans (Rhinanthus) (Veronica etc.). Bull. Soc. Chim. Biol., **5**, 258; **6**, 665 (1924). — 35a) ***Dies.,*** Alecterolophus minor renferme ... de l'aucuboside. Bull. Soc. Roy. Bot. Belg., **64**, 180 (1932). S.A. — 36) ***M. Bridel,*** Glucos. du Lathraea etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 620 (1929). — 37) ***M. Bergmann, G. Michalis,*** Glucosid Aucubin. Ber. Chem. Ges., **60**, 935 (1927). S.A. — 38) ***H. Hérissey,*** Gluc. dédoubl.... dans le Baillonia spic. C. R., **179**, 1419; Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 195 (1925). — 39) ***M. Braecke,*** Héteroside ... dans Bergenia. Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 1228 (1931). S.A. — 39a) ***A. E. Tschitschibabin c.s.,*** Nichtgerbende Subst. aus ... Badan (Saxifraga crassifolia). Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **469**, 93 (1929). — 40) ***H. Yü,*** Et. chim. de Buddleia. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 482, 616 (1933).

Solanaceen gefundene Scopolin (MERZ), wahrscheinlich identisch mit Fabriatrin aus *Fabriana imbricata* (41). Spaltung nicht geprüft.

Coronillosid, von TANRET 42) gefunden in *Coronilla scorpioides* und *C. varia* (*Leguminosae*). Giftiges Herzglykosid. Mandelemulsin soll nicht angreifen, Enzym aus *Aspergillus* ergibt ein Aglucon $C_{14}H_{18}O_3$ neben einem amorphen Körper.

Ein Cumarin-glucosid bisher nicht genauer bekannter Natur in *Asperula odorata* fand HÉRISSEY (l. c. 33).

Erytaurin in *Erythraea centaurium* (Tausendgüldenkraut), von HÉRISSEY 1908 beschrieben, liefert mit Emulsin ein Aglucon Erythrocentaurin; dasselbe liefert ein Glykosid aus *Swertia japonica Makino* (43).

Gein (Geosid) in *Geum urbanum* (H. W. S. 632) ist von HÉRISSEY (l. c. 7, 8) als Eugenolvicianosid sichergestellt worden. Ein besonderes Enzym Gease existirt nicht (§ 337).

Indican, das Glucosid des Indoxyls (H. W. S. 631) in den Indigo liefernden Pflanzen, vor allem also *Indigofera tinctoria* und *Isatis alpina*, ist ein einfaches Glucosid, das von ROBERTSON 44) synthetisch dargestellt worden ist. Die alten Angaben, daß hier bei der Spaltung ein besonderes Ferment **Indimulsin** nötig ist, können als überholt angesehen werden.

Loroglossossid (H. W. S. 599) ist von CHARAUX 45) und DELAUNEY 46) in weiteren Orchideen gefunden worden, z. B. *Listera ovata R.Br.*, *Epipactis palustris* und *E. atrorubens Crantz*. Ist während der Blüte verschwunden, dann nur das Aglucon nachweisbar; ferner in 2 *Ophrys* und 7 *Orchis*, *Goodyeara repens R.Br.*, *Limodorum abortivum Sw.*, *Spiranthes autumnalis Rich.*

Lusitanicosid fand im „Portugiesischen Lorbeer", *Cerasus lusitanicus Lois.* HÉRISSEY 47). Aglucon ein Phenol. Zucker eine durch kein Ferment spaltbare Biose, die keine Pentose enthält. Auch das Glykosid wird durch Mandel-emulsin sehr langsam gespalten, schneller durch ein Enzym der Pflanze selbst.

Melilotosid, aus *Melilotus altissima* und *M. arvensis*, zerfällt bei der Spaltung durch Emulsin in Glucose + Cumarsäure (CHARAUX 48)).

Neriin, Oleandrin. Der Oleander, *Nerium Oleander*, enthält in seinen Blättern sehr giftige Herz-glykoside, deren Zahl und Art nicht gesichert ist. Es gibt wohl zweifellos mehrere und verschiedenartige. Sichergestellt ist nur von einem kristallisirten Oleandrin, daß es als Aglucon Digitaligenin liefern kann (WINDAUS 1925). Hier sei als enzymtypisch registrirt, daß TANRET 49) an Präparaten sowohl von Neriin wie von Oleandrin eine schwache Spaltung durch Mandel-emulsin, eine schnelle durch Verdauungssaft von *Helix* gefunden hat. Dabei wird Glucose abgespalten, sowie ein nicht identifizirter Zucker, der keine Pentose sein soll. Es entstehen anscheinend sekundäre Glykoside, von denen nunmehr FLURY 50) eines rein dargestellt hat. Dies gehört zur Gruppe der Digitalis-Strophantus-glykoside durch sein Genin und wie es scheint auch seinen Zucker; wir werden deshalb dieses **Folinerin** erst § 361 besprechen. Vielleicht geht die Emulsin-spaltung TANRET's an einem anderen Glykosid vor sich, denn diese Glykoside sollen gegen Emulsin resistent sein.

Oleuropein, ein bitteres Glykosid aus Oliven (BOURQUELOT 1908, H. W. S. 600) wurde von CRUESS 51) neu untersucht. Vorhanden zu 1 %, aber in den einzelnen Handelssorten

41) ***G. R. Edwards, H. Rogerson,*** Constit. of Fabriana imbricata. Biochem. Jl., **21,** 1010 (1927). — 42) ***G. Tanret,*** Glyk. du . . . Coronilla. C. R., **198,** 1637 (1934); Bull. Soc. Chim. Biol., **16,** 941 (1934); BPh **81,** 593. — 43) ***T. Kariyone, K. Kashiwagi,*** Bestandt. des Tausendgüldenkrauts. Jl. Pharm. Soc. Japan, **54,** 233 (1934); Chem. Cbl. **1935,** I, 3293. — 44) ***A. Robertson,*** Synth. of indican. Jl. of Chem. Soc. **1927,** 1937. — 45) ***P. Delauney,*** Loroglossine etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **5,** 398 (1924); **7,** 1144; C. R., **180,** 224 (1925). — 46) ***C. Charaux, P. Delauney,*** Loroglossoside etc. C. R., **180,** 1770 (1925); Bull. Soc. Chim. Biol, **7,** 1148. — 47) ***H. Hérissey, J. Laforest,*** Hétéroside . . . du Cerasus lusit. C. R., **194,** 1095; Bull. Soc. Chim. Biol. **15,** 350 (1933). — 48) ***C. Charaux,*** Mélilotoside etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **7,** 1056 (1925). — 49) ***G. Tanret,*** Gluc. des feuilles du Laurier-Rose. Bull. Soc. Chim. Biol., **14,** 708 (1932). — 50) ***F. Flury, W. Neumann,*** Folinerin, Klin. Ws. **1935,** I, 562. S.A. — 51) ***W. V. Cruess, C. L. Alsberg,*** Bitter gluc. of the olive. Jl. Amer. Chem. Soc., **56,** 2115 (1934).

verschieden. Spaltung durch Emulsin oder Enzym aus *Penicillium* liefert neben Glucose ein Aglucon, das eine Ester-bindung enthält, und zwar von Kaffeesäure mit einem noch nicht näher bekannten Phenol. Diese Esterbindung wird durch Alkali sowie ein Enzym der Früchte selbst zerlegt.

Orobosid fand BRIDEL **52)** in *Orobus tuberosus L.* Es liefert ein Aglucon Orobol, das aber nicht das Chromogen ist, das die Pflanze schwarz färbt, wenn man sie trocknet, besonders die Blätter und die Wurzelknöllchen. Orobol ist anscheinend ein Tetraoxy-flavon. Das eigentliche Chromogen ist das Oroberol, das kein Glykosid ist. Darauf kommen wir bei den Phenolasen zurück. Das Glykosid Orobosid wird von Emulsin sehr langsam gespalten, da es so gut wie unlöslich in Wasser ist. *Orobus (Lathyrus) niger* enthält dagegen weder das Glykosid noch das Oroberol, sein Chromogen ist Arbutin (MEUNIER, l. c. 31).

Pedicularis palustris und *P. sylvatica* enthalten nach BRAECKE **52a)** ein durch Emulsin spaltbares noch nicht näher bekanntes Glykosid, das ebenfalls ein chromogenes Aglucon ergibt und für die Schwärzung der Pflanze verantwortlich ist. (Andere Scrofulariaceen enthalten Aucubin, s. o.).

Persicosid in der Rinde von *Persica vulgaris* (Pfirsich) (**52b)**). Emulsinspaltung liefert Glucose und Hesperitol = Trioxy-methoxy-flavanon.

Phlorizin wird nach BRIDEL **53)** im Gegensatz zu älteren Angaben wenn auch sehr langsam durch Emulsin gespalten. Identisch damit ist Asebotosid (s. o.). Aglucon ist Phloretin, ein Ester des Phloroglucins mit para-Hydrocumarsäure. Zucker sitzt an dem dem Säurerest benachbarten OH des Phloroglucins.

MOELWIN-HUGHES **53a)** hatte behauptet, daß dieser Zucker keine normale Glucose sei, eher eine Fructo-furanose, das Glykosid sollte von reiner Saccharase zerlegt werden. ROBERTSON **54)** zeigte aber, daß es ein ganz normales Glucosid ist wie alle anderen, sowohl durch Abbau wie durch Synthese eines Trimethyl-phlorizins aus Trimethyl-phloretin + Acetobrom-glucose.

Picein (Piceosid) (H. W. S. 600) ist von BRIDEL **55)** als identisch befunden worden mit Salinigrin, Salicinerein (l. c. 21) und Ameliarosid (l. c. 30). Das Aglucon ist para-Oxy-acetophenon. Identität vom Entdecker des Salinigrins, JOWETT, bestätigt (l. c. 20). Das Glykosid kommt seltsamerweise in 3 ganz getrennten Familien vor, und jedesmal nur in einigen wenigen oder sogar nur einer Art: *Coniferae Picea excelsa Link*; *Rosaceae Amelianchier vulgaris*; *Salicaceae Salix nigra, discolor, cinerea.* Ebenso spaltbar wie das Glykosid selbst sind einige N-haltige Derivate am Carbonyl (Oxim, Phenylhydrazon, Semicarbazon) (RABATÉ **56)**).

Polydatosid (BRIDEL **57)**) in *Polygonum cuspidatum*; Aglucon Polydatogenol unaufgeklärt.

Philyrosid **(Phillyrin)** aus 3 Arten von *Philyrea* (*Phillyrea*) sowie *Olea fragrans* und *Forsythia suspensa Vahl* (*Oleaceae*) liefert nach KRAMER **58)** als Aglucon Philygenol, ein mehrfach methoxylirtes Phenol $C_{21}H_{24}O_6$. Die Pflanze enthält weiterhin ein Glykosid mit dem Aglucon $C_{11}H_{14}O_4$. Ältere Angaben über Phillyrin von KOLLE **59)** sind damit unvereinbar (Nichtspaltung durch Emulsin, andere Formel); im Handbuch der Pflanzenanalyse von KLEIN findet sich eine noch andere Formel von EYKMANN (1886).

Scabiosid in Dipsaceen, neben β-Methylglykosid (WATTIEZ, l.c. 19); ergibt ein gelbes Aglucon.

Sophoricosid (**60)**) aus den Schotenfrüchten von *Sophora japonica*, Aglucon identisch mit dem in *Genista* gefundenen Genistein = 5,7,4'-Trioxy-flavonol.

---

52) ***M. Bridel, C. Charaux,*** Orobosíde etc. C. R., **190**, 387; Bull. Soc. Chim. Biol., **12**, 317, 615, 765 (1930). — 52a) ***M. Braecke,*** Hétérogluc. dédoubl. .. . dans le genre Pedicularis. Bull. Soc. Roy. Bot. Belg., **60**, 118; **66**, 9 (1928/33). S.A. — 52b) ***C. Charaux, J. Rabaté,*** Biochem. Unt. ... Persica vulg. Jl. de pharm. chim. (8) **21**, 495 (1935); Ch. Cbl. **1935**, II, 1021. — 53) ***M. Bridel,*** Hydrol. par emuls. ... de phlorizine. Bull. Soc. Chim. Biol., **12**, 921 (1930). — 53a) ***E. A. Moelwyn-Hughes,*** Enz. hydrol. of phlorizin. Jl. of gen. Phys., **13**, 807 (1930). — 54) ***A. Müller, A. Robertson,*** The hexose ... of phlorizin. Jl. of Chem. Soc. **1933**, 1170. — 55) ***M. Bridel, J. Rabaté,*** Repartit. du picéoside etc. C. R., **189**, 1304 (1929); Bull. Soc. Chim. Biol., **12**, 332 (1930). — 56 ***J. Rabaté,*** Glucos. azotés derivées du piceoside. ebd. **12**, 441 (1930). — 57) ***M. Bridel, C. Béguin,*** Rech. des glucos. hydrol. etc. (Polydatosid) Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 136 (1926). — 58) ***A. Kramer,*** Philyroside etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 665 (1933); C. R., **196**, 814. — 59) ***F. Kolle, Tr. Hjerlow,*** Phillyrin, Pharmac. Zthalle, **71**, 705 (1930). — 60) ***C. Charaux, J. Rabaté,*** Sophoricosid etc. Jl. de Pharm. Chim. (8) **21**, 546 (1935); Ch. Cbl. 1935, II, 1180.

Thelephiin (Sedum-glucosid) erhielt BRIDEL 61) aus *Sedum thelephium L.* Aglucon ein Öl unbekannter Struktur, dem Geruch nach dem Geraniol verwandt.

In *Toddalia aculeata* (*Rutaceae*) fand LOBSTEIN 62) ein nicht näher untersuchtes spaltbares Glykosid.

Unedosid erhielt BRIDEL 63) aus *Arbutus unedo L.* (*Unedo edulis Hg. et Link.*) Aglucon Unedol noch nicht erforscht. Ähnlich dem Glykosid von *Verbena.*

Verbenalin aus *Verbena officinalis* (H. W. S. 600, *l. c. 549*) ist nach REICHERT 63a) identisch mit **Cornin**, das von MILLER 63b) aus der Wurzelrinde von *Cornus florida L.* isolirt worden ist. Da der Name Cornin seit GEIGER (1834) bekannt ist, soll Verbenalin jetzt Cornin heissen.

Vicin (Viciosid) aus Wickensamen (*Vicia*) gibt mit Emulsin als Zucker nur Glucose (HÉRISSEY 64)); Aglucon Divicin ist von LEVENE 65) erkannt als 4,6-Dioxy-2,5-diamino-pyrimidin.

Vincoside: Arten von *Vinca* enthalten 3 Glykoside A, B, C (66) die durch Emulsin spaltbar sind. Eines davon enthält als Zucker Robinose (§ 361).

Violutosid aus mehreren Arten von *Viola* (PICARD 67)) enthält Methylsalicylat wie Monotropitosid, aber einen anderen Zucker, und zwar Vicianose. Dies folgt aus der Synthese des Glykosids durch ROBERTSON 68), der es durch Einführung von Arabinose in das Glucosid des Methylsalicylats erhielt.

Anhang: Steviosid. Die Spaltung dieses Glykosids ist vorläufig noch nicht unterzubringen. Es findet sich in den Blättern von *Kaa-he-e* (*Stevia rebaudiana Bertoni, Compositae*), wird auch Eupatorin genannt, und ist als sehr starker Süsstoff bekannt (300 mal so süß wie Saccharose). Es ist von BRIDEL 68a) rein dargestellt worden. Säurespaltung liefert ein Aglucon Steviol, ein Phenol $C_{20}H_{30}O_3$, sowie 3 Moleküle Glucose, anscheinend als Trisaccharid gebunden. Dieses Glykosid wird nun weder von Emulsin noch von Hefen angegriffen; nur Saft von *Helix* spaltet es langsam, aber fast vollständig. Wenn also einerseits die Art des Zuckers, andererseits die enzymatischen Befunde sich bestätigen lassen, so stehen wir hier vor einem bisher unlösbaren Problem, welche Art Enzym im *Helix*-saft dieses Glykosid spaltet. Zwar verhält sich Neriin (l. c. 49) ähnlich, aber hier scheinen doch andere Zucker vorzuliegen (l. c. 50). Auch der Fall des Lusitanicosids (l. c. 47) liegt ähnlich.

§ 342. Sondergruppe der durch „Rhamnodiastase" spaltbaren Glykoside. Wir haben § 337 darauf hingewiesen, daß nach BRIDEL selbst die von ihm verfochtene Sonderexistenz einer Rhamnodiastase aufzugeben ist, er hat sie in die einheitliche Glucosidase des Emulsins zurückgeführt, die nur gewisse Besonderheiten zeigt, wie dies eben bei anderen Enzymen auch vorkommt, wenn die Substrate wechseln. Dies ist in der Hauptsache auch zweifellos richtig, aber eben nur in der Hauptsache; denn, wie wir gleich sehen werden, enthält die bisherige Rhamnodiastase als Sammelbegriff auch noch Enzyme, die nicht so einfach als Glucosidasen angesprochen werden können. Jedenfalls liegen die Dinge noch nicht ganz klar, und auch wegen der chemischen Zusammenhänge ist es vorläufig zweckmäßiger, die durch Rhamnodiastase spaltbaren Heteroside noch zusammenzufassen.

Diese Gruppe wurde zunächst von BRIDEL 69) dadurch charakterisirt, daß es sich

61) ***M. Bridel***, Glucos. . . . dans Sedum Thelephium. C. R., **174**, 186 (1922). — 62) ***J. C. Lobstein, P. Hesse***, Etude du . . . Toddalia aculeata. Bull. Sci. Pharm. **38**, 157 (1931); BPh **64**, 412. — 63) ***M. Bridel, C. Bourdouil***, Unédoside etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **12**, 910 (1930). — 63a) ***B. Reichert***, Ident. des Verbenalins mit Cornin. Arch. der Pharm. **273**, 357 (1935). — 63b) ***E. R. Miller***, Cornin. Jl. Amer. Pharm. Ass. **17**, 744; Ch. Cbl. **1930**, I, 2744. — 64) ***H. Hérissey, J. Cheymol***, Vicioside. C. R., **191**, 387; Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 29 (1931). — 65) ***P. A. Levene, J. K. Senior***, Vicine etc. Jl. of Biol. Chem., **25**, 607 (1916). — 66) ***J. Vintilesco, N. J. Joanid***, Glucosides de . . . genre Vinca etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 63 (1933). — 67) ***P. Picard***, Violutoside. C. R., **182**, 1167 (1926). — 68) ***A. Robertson, B. B. Waters***, Methyl-Salicyl. Vicianoside. Jl. of Chem. Soc. **1932**, 2770. — 68a) ***M. Bridel, R. Lavieille***, Sur le princ. sucré de . . . Stevia etc. C. R., **192**, 1123; **193**, 72 (1931); Bull. Soc. Chim. Biol. **13**, 656. — 69) ***M. Bridel, C. Charaux***, Rech. dans les végét. des glucos. etc. C. R., **181**, 1167; Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 40 (1926).

eben um solche Glykoside handelt, die nicht durch Mandel-emulsin, sondern durch Rhamnodiastase, d. h. das Enzym aus *Rhamnus*-samen gespalten werden; diese Trennung führte z. T. zur Unterscheidung chemisch bekannter Heteroside, z. T. aber nur zum Nachweis derart spaltbarer Glykoside in Pflanzen überhaupt. Da die Einheit von Glucosidase mit Rhamnodiastase nunmehr von BRIDEL selbst proklamirt wird, so ist diese summarische Methode nicht mehr zulässig und hat im übrigen zu unmöglichen Konsequenzen geführt, so beim Polydatosid, einem angeblich nur durch Rhamnodiastase spaltbaren einfachen Glucosid. Die Abgrenzung ist vielmehr nur noch rein chemisch möglich: die Gruppe umfaßt einige Glykoside, die nicht nur einfache Glucose am Aglucon enthalten, sondern kombinirte Zucker, Di- und Trisaccharide verschiedener Art. Auch hier ist die Grenze unsicher, man kann z. B. die Vicianoside mit hierher rechnen, wie es BRAECKE (l. c. 1) tut, oder nicht, weil eigentlich an deren Spaltung durch Emulsin kein Zweifel bestehen kann. Wir haben hier das Vicianin selbst bei den cyanogenen Glykosiden abgehandelt, es bleibt dann nur Gein und Violutosid, die wir bei den normalen Glykosiden § 341 mit erledigt haben. Was dann für die Rhamnodiastase als Substratgruppe übrig bleibt, ist eine an sich ziemlich zusammenhanglose Gruppe von Biosiden etc. Einerseits die Heteroside der Primverose, also einer Xylosido-glucose, und andererseits Heteroside anderer Mehrfach-zucker, die u.a. Rhamnose und Galactose enthalten. Bei der Rhamnodiastase handelt es sich natürlich immer nur um die Spaltung der Aglucon-bindung; was für Enzyme die dabei entstehenden Mehrfach-zucker spalten, darüber wissen wir noch so gut wie nichts.

Wir kommen also auch mit der neuen Erklärung von BRIDEL, daß seine Rhamnodiastase einfach Glucosidase ist, in unlösbare Schwierigkeiten, schon deswegen, weil ein Teil dieser Heteroside überhaupt keine Glucose enthält. Dabei handelt es sich in der Hauptsache um die Glykoside Xanthorhamnin und Robinin (H. W. S. 635). Sie enthalten neben Flavonolen als Aglucon zwei isomere Trisaccharide Rhamninose und Robinose, die beide aus 2 l-Rhamnose + 1 Galactose bestehen (CHARAUX 70)). Wenn also nun die Rhamnodiastase eine Glucosidase sein soll, dann kann sie diese Heteroside nicht spalten, denn die Identität der Galactosidase mit der Glucosidase ist doch nicht mehr aufrecht zu erhalten (§ 332). Wir wissen dazu noch von diesen Heterosiden nicht, ob das Aglucon an der Galactose oder an der Rhamnose sitzt, und nicht, ob die Galactose α oder β ist. Wir können nur vermuten, daß die Galactose am Aglucon sitzt, weil angeblich l-Rhamnoside überhaupt nicht spaltbar sein sollen. Es handelt sich also wahrscheinlich bei der Spaltung dieser Glykoside um die Wirkung einer α- oder β-Galactosidase in den Präparaten, aber sicher ist dies nicht; es spricht sogar die biologische Stellung dieser Glykoside eher für eine Rhamnose am Aglucon, weil in nahe verwandten Pflanzen Heteroside der Rhamnose vorkommen. Wir wissen also bisher so gut wie nichts über die Zerlegung dieser Glykoside in bezug auf die dabei tätigen Enzyme, und so müssen wir sie vorläufig bei den anderen noch unerforschten Heterosidasen § 361 unterbringen, nicht hier bei der Rhamnodiastase als Glucosidase betrachtet. Daß wir auch über die holosidische Spaltung der entstehenden Mehrfach-zucker nichts wissen, ist bereits erwähnt, wir haben diese vorläufig als Anhang bei der β-Galactosidase § 332 untergebracht.

Was hier noch verbleibt, sind einige Heteroside von Pentosido-glucosen, aber zweifellos mit der Glucose am Aglucon, nämlich von der Primverose, also einer Xylosido-glucose, und der Rutinose, einer l-Rhamnosido-glucose.

Heteroside der Rutinose. Rutinose, zuerst aus Rutin (Rutosid) rein dargestellt von

70) *C. Charaux,* Dédoubl. bioch. du robinoside. Bull. Soc. Chim. Biol., 8, 915 (1926).

Abgeschlossen: 17. 9. 1935. Ber. Phys. 87. H. 1/2.

Charaux 71), ist eine 6, β l-Rhamnosido-β-d-Glucose, wie Zemplén 71a) durch Vergleich des aus Rutin durch ein Enzym aus *Rhamnus utilis* hergestellten Zuckers mit einem von ihm früher synthetisch hergestellten festgestellt hat. Über die Spaltung des Zuckers selbst durch irgend ein Enzym ist nichts Sicheres bekannt. Von ihm leiten sich bisher folgende spaltbare Glykoside ab:

Rutin (Rutosid) findet sich in *Ruta graveolens* und anderen Arten, sowie in *Sophora*, da es mit Sophorin identisch ist (Charaux 71)). Sein Aglucon ist Quercetin, ein Tetra-oxy-flavonol; es sitzt an C 1 der Glucose.

Rutin ist ein sehr weit verbreitetes Glykosid, es kommt z. B. auch in *Viola*, *Polygonum* u. a. vor. Bridel 72) gab bereits 1926 an, daß es in 17 Familien aus drei Gruppen von Dicotyledonen gefunden war, seitdem sind noch 2 hinzugekommen: Gollan 73) fand es in Blüten von *Forsythia pendula L.* (*Oleaceae*), sowie in *Eschholtzia*, Rabaté 74) in *Bupleurum falcatum*.

Quercetin als Aglucon enthält auch das Glykosid **Quercitrin** aus der Rinde der Färbereiche *Quercus tinctoria*, es ist aber mit Rutin nicht identisch. Der Zucker enthält ebenfalls Rhamnose, ob er mit Rutinose identisch ist, also nur eine Stellungsisomerie vorliegt, oder ein anderer Zucker, ist noch nicht festgestellt. Über Spaltung durch Emulsin finde ich keine Angaben, Enzym aus *Aspergillus* spaltet nach Noack 75). Ein Iso-quercitrin mit dem Zucker in 3 fand Oku 75a) in Maulbeerblättern (*Morus*); derselbe ein ähnliches Glykosid Bombycin, das nicht in den Blättern vorkommt, in den Kokons der grünen Art der Seidenraupe *Bombyx mori*, das also anscheinend im Tierkörper gebildet wird.

Datiscin fand Charaux 76) in *Datisca cannabina*. Aglucon Datiscetin ist ein Tri-oxy-flavonol $C_{15}H_{10}O_6$; es ist synthetisch hergestellt (cit. n. l. c. 1).

Ebenfalls Rhamnose enthalten die sog. **Anthraglykoside**, die in den purgirenden Rinden besonders von *Rhamnus*-Arten vorkommen. Aber hier liegen die Verhältnisse insofern anders, als in den wenigen genauer untersuchten Fällen die l-Rhamnose am Aglucon sitzt, und diese Heteroside bisher als unspaltbar gelten. Darauf kommen wir § 361 zurück. Die Spaltung durch Emulsin bezieht sich nur auf die Ablösung dieser Rest-glykoside aus höheren Komplexen von Zuckern, also eine holosidische Spaltung durch eine Glucosidase, wie wir dies auch in den ähnlich gelagerten Fällen der Glykoside der *Scilla*, der *Digitalis* etc. vorfinden (§§ 334, 342a).

So sei hier nur der am besten erforschte Fall kurz vorausgeschickt: Bridel u. Charaux 77) fanden in der Rinde von *Rhamnus frangula* ein solches Heterosid eines Trisaccharids aus 2 Glucose + 1 l-Rhamnose mit Emodin als Aglucon. Bei der Spaltung mit Emulsin werden die beiden Glucosen abgespalten und es verbleibt ein nun angeblich gegen Enzyme überhaupt resistentes Glykosid Frangulosid, das ein l-Rhamnosido-emodin ist; identisch mit dem Rhamnoxanthin aus *Rhamnus cathartica L.* Dieselbe partielle Spaltung bewirkt ein Enzym der Rinde selbst beim Lagern der Rinde. Näh. § 361.

Heteroside der Primverose. (Genauere Angaben l. c. 1). Primverose ist eine Xylosido-glucose (Formel § 333), aufgefunden zuerst in einigen Glykosiden aus Arten von *Primula*, nämlich **Primverosid** und **Primulaverosid** (H. W. S. 631). Die Aglucone sind die Methyläther der Methoxy-resorcylsäure resp. Methoxy-salicylsäure (vgl. aber unten). Die

71) ***C. Charaux,*** Dédoubl. bioch. de la rutine. C. R., **178**, 1312; Bull. Soc. Chim. Biol., **6**, 631 (1924). — 71a) ***G. Zemplén, A. Gerecs,*** Konst. u. Synth. der Rutinose. Ber. Chem. Ges. **68**, 1318 (1935). — 72) ***M. Bridel, C. Béguin,*** Rech. bioch. sur la compos. du Salix etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 901 (1926). — 73) ***J. Gollan,*** Rutoside dans ... Forsythia etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 1164 (1929). — 74) ***G. Rabaté,*** Rutoside dans ... Bupleurum. ebd. **12**, 974 (1930). — 75) ***K. Noack,*** Anthocyanstoffwechsel. Zs. Bot., **10**, 561; **14**, 1 (1922). — 75a) ***M. Oku,*** Farbstoffe der Rohseidenfaser VII, VIII. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **10**, 158, 164 (1934); Chem. Cbl. **1935**, II, 528. — 76) ***C. Charaux,*** Datiscine etc. C. R., **180**, 1419 (1925); Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 618 (1925). — 77) ***M. Bridel, C. Charaux,*** Franguloside. C.R., **191**, 1151, 1374; **192**, 1269 (1930/1); Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 642, 648 (1933); BPh **75**, 423.

holosidische Bindung in der Biose selbst wird enzymatisch zerlegt durch ein zunächst von BRIDEL Primverase genanntes Enzym, das aber zweifellos mit der β-Glucosidase identisch ist (§ 333); das Enzym, das die Aglucon-bindung löst, nannte BRIDEL (l. c. 2) zuerst Primverosidase, erklärte es aber dann mit Rhamnodiastase für identisch, dann mit Glucosidase überhaupt (§ 337).

Es finden sich aber außer diesen beiden zuerst bekannt gewordenen noch weitere Heteroside der Primverose natürlich vor. BRIDEL 78) stellte zunächst fest, daß das längst bekannte Glykosid Gaultherin, z. B. aus der Rinde von *Betula lenta*, das Methylsalicylat als Aglucon enthält, kein α-Glykosid ist (§ 330), vielmehr identisch mit dem schon früher (*l. c. 537*) von ihm untersuchten Monotropitosid aus *Monotropa hypopitys*. Dann (79) stellte er fest, daß dieses Glykosid Primverose als Zucker enthält, und außerdem noch zwei andere, nämlich Gentiacaulosid in *Gentiana acaulis* (*l. c. 527*) und Rhamnicosid in der Rinde von *Rhamnus cathartica*. Es sind also bisher 5, vielleicht 6 (s. u.) natürliche Heteroside der Primverose bekannt.

Monotropitosid enthält als Aglucon Methyl-salicylat (BRIDEL 80), 81)). Es findet sich außer in *Betula lenta* und *Monotropa hypopitys* sowie Arten von *Spiraea* auch als Hauptglykosid in *Gaultheria procumbens* (BRIDEL 82)) und tritt an die Stelle des dort lange Zeit angenommenen Gaultherins (§ 330). *Gaultheria* enthält außerdem noch ein unspaltbares Glykosid Gaultheriosid mit einer wahrscheinlich anders gebundenen Xylose (RABATÉ 83)). In *Monotropa* findet sich das Glykosid in erheblichen Mengen in der ganzen Pflanze, auch nach dem Trocknen (84). Darstellung am besten aus der Rinde von *Betula lenta* (85). Synthese von ROBERTSON 86): Darstellung erst des Glucosids des Methyl-salicylats, dann Xylosirung nach derselben Methode wie bei der Synthese der Primverose selbst, indem er auf das Triacetylderivat Triacetylxylosyl-bromid einwirken ließ.

Gentiacaulosid enthält als Aglucon Gentiacauleol, ein Flavonderivat (BRIDEL 87)). Es findet sich in der ganzen Pflanze von *Gentiana acaulis*. **Primverosid:** zu H. W. S. 631 zu ergänzen: Synthese aus dem Glucosid des 4-Methyl-4-methoxysalicylats wie beim Monotropitosid (JONES u. ROBERTSON 88)). **Primulaverosid**: Reindarstellung von GORIS 89) aus *Primula acaulis Jacq.*, die kein Primverosid enthält. Identifizierung des Aglucons als Methoxyhydrochinon-carbonsäure-methylester.

Rhamnicosid enthält als Aglucon Rhamnicogenol, ein Penta-oxy-methyl-anthranol $C_{15}H_{12}O_6$; es leitet also zu den eigentlichen Anthraglykosiden über (§ 361). Es findet sich in der Rinde von *Rhamnus cathartica*, dem sog. „*Nerprun*". (BRIDEL u. CHARAUX 90), 91)). Das Glykosid ist die Muttersubstanz des „Chinagrüns" (*Lokao*). Es findet sich in 6 von 12 unter-

---

78) ***M. Bridel***, Sur la vér. nat. du gluc. à salicyl. de méthyl etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **6**, 659 (1924); Jl. de Pharm. Chim., **30**, 304 (1924). — 79) ***Ders.***, Primvérose etc. C. R., **180**, 1421 (1925); Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 925 (1925). — 80) ***Ders.***, Prés. de la monotrop. dans Spiraea etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **6**, 679 (1924). — 81) ***Ders.***, Hydrol. ferm. de la monotropitoside. C. R., **179**, 991; Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 52 (1925). — 82) ***M. Bridel, S. Grillon***, Le gluc. à salicyl. de méthyle du Gaulthéria etc. C. R., **187**, 609; Bull. Soc. Chim. Biol., **10**, 1326 (1928). — 83) ***J. Rabaté c.s.***, Gaulthérioside etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 604 (1931). — 84) ***M. Bridel, S. Grillon***, Prés. de ... monotrop. dans le Gaulth. proc. Jl. de Pharmac. Chim. (VIII), **9**, 193 (1929). — 85) ***M. Bridel, P. Picard***, Prépar. etc. du monotrop. Jl. de Pharmac. Chim. (VIII), **3**, 49 (1926). — 86) ***A. Robertson, R. B. Waters***, Synth of monotropit. Jl. of Chem. Soc. **1931**, 1881. — 87) ***M. Bridel***, Hydrol. ferm. du gentiacaulos. C. R., **179**, 780 (1924); **180**, 1421; Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 31 (1925). — 88) ***E. T. Jones, A. Robertson***, Synth. of primeverin. Jl. of Chem. Soc. **1933**, 1618. — 89) ***A. Goris, H. Canal***, Essence et hetéroside de Primula acaulis. C. R., **199**, 1675 (1934); BPh **85**, 483. — 90) ***M. Bridel, C. Charaux***, Glucos. instable de l'écorce de Rhamnus cath. C. R., **180**, 857, 1047 (1925). — 91) ***Dies.***, Hydrol. ferm. du rhamnicoside. C. R., **180**, 1219 (1925); Jl. de Pharmac. Chim., (8) **2**, 427 (1925); Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 811, 822 (1925).

suchten Arten von *Rhamnus*, die alle eine lose Rinde und Dornen haben. Auch hier finden wir ähnliche Verhältnisse wie oben beim Frangulosid erwähnt; denn auch dies Glykosid ist nur ein Teil eines größeren Komplexes, der aber spontan in Wasser zerfällt und dabei noch andere Anthrachinon-glykoside freigibt, die ebenfalls Primverose enthalten.

Zu dieser Gruppe gehört anscheinend noch das noch nicht genauer erforschte Ulexosid aus den Blüten von *Ulex europaeus* (BRIDEL **92**)).

Endlich wird man zu dieser Gruppe wohl auch die lange umstrittene Spaltung der **Ruberythrinsäure** zu setzen haben, obgleich die Dinge noch nicht klar liegen. Dieses Glykosid des Krapps (*Rubia tinctorum*) mit dem Aglucon Alizarin soll durch ein besonderes Enzym **Erythrozym** gespalten werden (H. W. S. 633), jedoch steht diese Angabe auf ebenso schwachen Füßen wie immer bei diesen älteren Befunden. Es wird wieder berichtet, daß Erythrozym auf Amygdalin ohne Wirkung ist, was sehr wenig besagen will, und daß andererseits Emulsin das Glykosid nur schwach angreift, was aber nach ROBERTSON **95**) nicht einmal stimmt, denn er fand ganz normale Spaltung durch Emulsin. Wenn wir also dies Glykosid nicht bei den ganz normalen Glucosiden mit behandelt haben, so hat dies seinen Grund darin, daß es anscheinend auch eine Pentose enthält, nicht, wie man früher annahm, nur biosidisch gebundene Glucose. Die Struktur des Zuckers ist aber noch nicht aufgeklärt.

Synthetische Versuche von ZEMPLÉN u. MÜLLER **93**), **94**), sowie ROBERTSON **95**), haben bisher nur gezeigt, daß das Glykosid weder das Cellobiosid noch das Gentiobiosid des Alizarins ist; ebenso wenig das Maltosid. Anscheinend ist der Zucker eine Pentosidoglucose, aber nicht Primverose, vielleicht ist auch hier wie bei anderen Anthraglykosiden Rhamnose vorhanden (JONES u. ROBERTSON **96**)). Ein ähnliches Glykosid Galicid, mit Purpurin als Aglucon, enthalten *Rubia peregrina* und *Galium verum*; hier scheint nur eine Pentose gebunden zu sein wie beim Frangulosid (HILL **97**)).

§ 342a. Abweichende biosidische Spaltungen. In enzymtypisch vorläufig noch recht unklare Verhältnisse kommen wir, wenn wir einige neuerdings, besonders von STOLL, beobachtete Fälle kennen lernen, in denen wieder in genuinen Glykosiden erst einmal Biosen zerlegt werden, ehe die Spaltung am Aglucon ansetzt, wenn diese überhaupt existirt. Diese Zerlegung der biosidischen Bindungen an sich ist uns ja nunmehr bekannt; aber in diesen Fällen soll eben nicht Emulsin, auch nicht unter Miteinbeziehung der Rhamnodiastase, auf diese biosidischen Bindungen wirken, sondern eigene Spezialenzyme, die nur in den betr. Pflanzen selbst vorhanden sind. Nur deshalb trennen wir eben diese Spaltungen vorläufig ab; denn sonst ist das Bild dasselbe, wie z. B. beim Frangulosid, denn auch hier sollen erst die Enzyme aus den Holosiden Glucose abspalten und dann das Aglucon an einen anderen Zucker gebunden zurücklassen, und diese neuen sekundären Heteroside sollen nun überhaupt enzymatisch unspaltbar sein. Auf diese Heteroside an sich kommen wir § 361 zurück; hier wollen wir wegen des Zusammenhanges nur diese merkwürdigen Biosidspaltungen schildern. Sie sind um so sonderbarer, als meist die auf anderem Wege frei dargestellte Biose überhaupt enzymfest ist. Diese Sachlage erinnert also an das Amygdalase-problem, und dort (§ 334) haben wir

92) ***M. Bridel, C. Béguin,*** Nouv. glucos. ... de l'Ulex. C. R., **183**, 75; Bull. Soc. Chim. Biol., 8, 895 (1926). — 93) ***G. Zemplén, Al. Müller,*** Alizaringlykosid etc. Ber. Chem. Ges., **62**, 2107 (1929). — 94) ***A. Müller,*** Synthet. Anthraglykoside. Arb. Ung. biol. Forsch. Inst., **5**, 224 (1932); BPh 74, 235. — 95) ***A. Robertson,*** Alizarin glucosides. Jl. of Chem. Soc. **1930**, 1136. — 96) ***E. T. Jones, A. Robertson,*** Ruberythric acid. ebd. **1933**, 1167. — 97) ***R. Hill,*** A new glykos. from madder (Rubia). Nature **1934**, II, 628.

bereits darauf hingewiesen, daß diese Spaltungen eigentlich zum Kap. Holosidasen gehören, und daß wir nur wegen des Zusammenhanges mit den anderen Heterosidspaltungen sie hier mitteilen wollen. Sie bilden einen Teil des bisher noch nicht einmal aufgestellten Problems, warum sich freie Biosen enzymtypisch anders verhalten können, als wenn sie in Aglucon-bindung stehen, wie es uns eben beim Amygdalin zuerst vor Augen gekommen ist. Die Biosen, um die es sich hier handelt, sind allerdings ganz anderer Natur, und so ist es wohl möglich, daß hier wirklich Spezialenzyme am Werke sind. Es handelt sich um Biosen teils mit Rhamnose, teils mit sonst nicht vorkommenden Zuckern, wie Digitoxose und Cymarose, sowie noch weiteren. Die bisher für die natürlichen Heterobioside beschriebenen Zucker, wie Primverose und Vicianose, spielen hier keine Rolle.

Scillarenase. In dem ersten hierhergehörigen Fall handelt es sich um die Spaltung einer Biose aus Rhamnose und Glucose. STOLL **99—103)** fand in der Meerzwiebel *Scilla maritima* ein in der frischen Zwiebel vorhandenes genuines Glykosid **Scillaren A**, das er rein darstellen konnte. Seine Formel ist $C_{37}H_{54}O_{13}$. Wenn man aber die Pflanze lagern läßt, so tritt eine enzymatische Spaltung ein, es entsteht unter Abspaltung einer Glucose ein neues Glykosid **Proscillaridin A.** Das Enzym Scillarenase findet sich nur in *Scilla* und *Digitalis*, und ist spezifisch eingestellt eben auf Scillaren oder wenigstens auf die Scilla-glykoside überhaupt, ist also jedenfalls nicht die allgemeine Hetero-glucosidase. Das bei dieser Spaltung entstehende sekundäre Glykosid Proscillaridin A ist enzymatisch überhaupt unspaltbar. Es enthält am Aglucon Scillaridin A, das den Gallensäuren nahesteht (§ 361), nunmehr als Zucker nur noch eine Rhamnose.

Das Enzym Scillarenase läßt sich anreichern in dem Schleim von *Scilla* durch Autolyse und Behandlung mit Talk. Es läßt sich nicht in Lösung bringen; es ist durchaus ein Desmoenzym, das aus den Zellen durch kein Mittel, auch nicht durch zellwand-abbauende Fermente freizulegen ist. Es kann also nur in feinsten Suspensionen untersucht werden. Opt. ph = 5—6. Temp. Opt. 37°, 98° zerstört. Aethanol hemmt, Methanol und Essigester schädigen das Enzym. Ausfällung der Zellsubstanz mit Ammonsulfat schaltet die Enzymwirkung aus.

Die Bindung der Rhamnose an Glucose läßt sich nachweisen, wenn man das genuine Glykosid mit Säuren zerlegt. Dann erhält man die Biose frei, die **Scillabiose**, die nun eben eine Glucosido-rhamnose ist. Und diese Biose ist gegen jegliche Enzymwirkung resistent. Dies eben ist der oben genannte Fall, daß man zwar im ganzen Komplex die Glucose aus der holosidischen Bindung loslösen kann, aber nicht mehr im freien Zustande; er erinnert an die Sachlage beim Amygdalin, nur daß hier die Enzymspaltung bei der isolirten Biose ganz fehlen soll.

Neben dem Scillaren A findet sich noch ein anscheinend nicht einheitliches Scillaren B mit einem Aglucon $C_{15}H_{18}O_{3}$; über seine enzymatische Spaltung liegen noch keine Angaben vor **(103)**.

Digipurpidase, Digilanidase. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei den genuinen Glykosiden aus *Digitalis purpurea* und *D. lanata*. Auch hier liegen komplexe Glykoside vor, die durch ein autochthones Enzym in der Holosidbindung gespalten werden, wonach sekundäre unspaltbare Glykoside zurückbleiben.

---

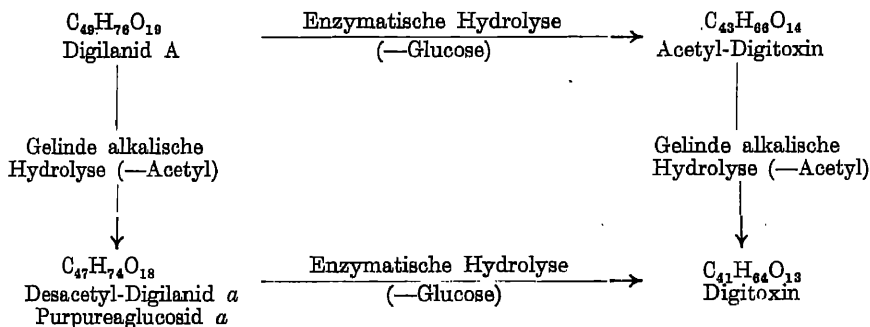
99) ***A. Stoll, W. Kreis,*** Digitalis- und Scillaglucoside. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. **1932**, 331, 435. — 100) ***A. Stoll c.s.,*** Herzaktive Substanzen der Meerzwiebel. Helv. Chim. Acta, **16**, 703, 1049 (1933). S.A. — 101) ***A. Stoll, W. Kreis, A. Hofmann,*** Scillarenase. Zs. phys. Chem., **222**, 24 (1933). S.A. — 102) ***A. Stoll,*** Isol. empfindlicher Naturstoffe. Mitt. Lebensm.-Unt., **25**, 196 (1934). S.A. — 103) ***Ders.,*** Scilla- und Digit.-Glyk. Pharm. Acta Helv., **9**, 145 (1934). S.A.

Stoll c.s. **102—105)** fanden, daß zwar die Enzyme aus *Digitalis* auch auf Scillaren wirken, aber nicht umgekehrt Scillarenase auf die Glykoside der *Digitalis*. Er hält also die Enzyme der *Digitalis* für eigene Enzyme und zwar gibt es zwei verschiedene in den beiden genannten Arten: Digipurpidase und Digilanidase.

Diese äußerste Verfeinerung der Spezifität hat Stoll freilich nicht aufrecht erhalten **(103)**. Die tatsächlichen Feststellungen Stoll's sind folgende: er hat sowohl aus *D. purp.* wie *lanata* die genuinen Glykoside isolirt, was dadurch möglich ist, daß man die Fermentwirkung ausschaltet. Es gibt drei solcher Glykoside A, B, C von ganz analogen Aufbau. Die 3 Lanata-glykoside **(Digilanide)** enthalten immer eine Acetyl-gruppe mehr als die entsprechenden **Purpurea-glykoside** A und B; C fehlt bei *Dig. purp.* **(105)**. Der Unterschied zwischen A, B, C unter einander liegt nur in den Agluconen: A enthält stets Digitoxigenin, B Gitoxigenin, C Digoxigenin. Über diese Aglucone noch einige Worte § 361. Hier interessirt nur der enzymatische Abbau der genuinen Glykoside. Die relative Spezifität erschließt Stoll daraus, daß Lanata-glykoside durch Enzym aus *D. purp.* schwerer angegriffen werden, wohl aber leicht, wenn man die Acetylgruppe abspaltet, also zu dem Glykosid aus D. purp. abbaut. Dagegen werden die acetylhaltigen Lanata-glykoside durch Enzym aus *D. lanata* leicht gespalten. Die Fermente sind also in beschränktem Maße artspezifisch (s. u.).

Dagegen ist ihre Wirkung die gleiche: sie entfernen aus dem komplexen Zucker des genuinen Glykosids in jedem Falle nur eine Glucose. Dabei bleiben also sekundäre Glykoside übrig, die einzigen, die man bisher gekannt hat, und zwar bei den Purpurea-glykosiden je nachdem Digitoxin, Gitoxin oder Digoxin; bei den Digilaniden die 3 entsprechenden Acetylderivate. Damit ist die Ferment-spaltung beendet, die sekundären Glykoside sind fermentfest. Sie enthalten am entspr. Aglucon (Genin) gebunden noch einen Zuckerkomplex, der aus drei Molekülen Digitoxose besteht (§ 361).

Ganz anders verläuft die Säure-spaltung. Diese greift einerseits an der Aglucon-bindung an, macht also das Genin und den gesamten Zucker frei; aber gleichzeitig spaltet sie den Mehrfach-zucker so auf, daß zwei Moleküle Digitoxose frei werden, das dritte aber mit der Glucose verbunden als Biose, **Digilanidobiose**, erscheint, und nun wieder fermentfest ist. Es liegen hier also genau dieselben Verhältnisse vor, wie bei den Glykosiden aus *Scilla*.

Abbau des Digilanids a zum Digitoxin.
nach Stoll **102)**

Über die **Enzyme selbst** macht Stoll **103)** einige Angaben. Beide sind wie die Scillarenase ausgesprochene Desmo-enzyme, sind auf keine Weise aus den Zellen heraus in Lösung zu bringen, auch nicht mit zellwandabbauenden Fermenten. Organische Lösungsmittel schädigen, es kann also nur in feinen Suspensionen in Wasser gearbeitet

104) ***A. Stoll, W. Kreis,*** Genuine Digitalis-Glykoside. Münch. Med. Ws., **1933**, I, 723; sowie Bull. Sci. pharmac., **40,** 321 (1933). S.A.; Helv. Chim. Acta, **16,** 1058; **17,** 595 (1933/4). — 105) ***Dies.,*** Genuine Glykos. der Digit. purpur. Helv. Chim. Acta, **18,** 120 (1935). S.A.

werden. Temp. Opt. 37°, opt. ph = 6,5—7. Die absolute Spezifität der beiden Enzyme hat sich nicht bestätigt; beide greifen beide Gruppen von Glykosiden an, aber immerhin mit stark verschiedener Reaktions-geschwindigkeit; in jedem Falle werden die arteigenen Glykoside schneller gespalten. Sie unterscheiden sich also durch eine relative Substratspezifität; ob man sie danach als „verschiedene Enzyme" oder als Abarten desselben Enzyms bezeichnen will, ist nach unseren immer wieder angestellten Überlegungen keine sachliche, sondern eine Definitionsfrage.

Strophantobiase u. Ae. Dieser Typus von Enzymspaltungen genuiner komplexer Glykoside scheint bei den anderen ähnlichen Herzgiften mit den Sterinen verwandten Geninen weit verbreitet zu sein, das Gebiet ist anscheinend noch durchaus nicht erschlossen; es seien die wenigen bisher gesicherten Ergebnisse zusammengestellt.

Die genuinen Glykoside aus den Samen von *Strophantus* hat Jacobs **107), 108)** aufgefunden und genauer untersucht. Auch hier finden sich Glykoside mit komplexen Zuckern, die durch ein Enzym der Pflanze selbst in eine Glucose und sekundäre Glykoside gespalten werden, als deren Zucker hauptsächlich Cymarose auftritt. Über diese sekundären Glykoside s. § 361.

Dies wurde zuerst bei *Str. kombé* genauer untersucht. Dessen Samen enthält ein komplexes Glykosid **Strophantin**, aus dem das arteigene Enzym **Strophantobiase** in der Art, wie wir es nun schon kennen, eine Glucose abspaltet und das sekundäre Glykosid **Cymarin** zurückläßt. Die Samen scheinen daneben schon Cymarin selbst zu enthalten, sowie noch weitere höhere Glykoside. Das Glykosid der Samen selbst ist also Glucosido-cymarin. Spaltet man aber mit Säuren, so löst man die Biose selbst vom Genin ab, die **Strophantobiose**, also eine Glucosido-cymarose; über das Verhalten dieser Biose gegen Enzyme finde ich keine Angaben, gegen verdünnte Säuren ist sie recht resistent. Neben dem kristallisirten Strophantin k (β) kommen noch überwiegend amorphe Glykoside vor, die weitere Glucosereste enthalten, als Trisaccharide und höhere Komplexe **(107)**.

Das Glykosid Cymarin, das bei der Enzymspaltung entsteht, enthält als Genin das Strophantidin $C_{23}H_{32}O_6$, als Zucker Cymarose (§ 361). Cymarin oder eher verschiedene Cymarine kommen auch in mehreren Arten von *Apocynum* vor (s. u.).

Das Enzym findet sich am reichlichsten in *Str. courmonti*, so daß dessen Samen kaum noch das intakte Glykosid Strophantin enthält.

Die genuinen Glykoside scheinen in verschiedenen Abarten vorzukommen, was vielleicht die Verschiedenheit der einzelnen Samen, z. B. *Str. kombe* und *hispidus* **(109)** erklären kann. Andererseits gibt es auch mehrere Cymarine mit verschiedenen Geninen, und diese können wieder in den genuinen Glykosiden mit verschiedenen Zuckern gebunden sein; ferner gehen bei der Spaltung des Strophantin k Umlagerungen sterischer Art vor sich **(110)**; auf diese Einzelheiten können wir hier nicht eingehen. Ein abweichender Zucker kommt z. B. in dem Glykosid von *Str. sarmentosus* vor **(111)**. Hier liefert das genuine Glykosid nach enzymatischer Abspaltung einer oder mehrerer Glucosen ein anderes Cymarin, Sarmentocymarin $C_{30}H_{46}O_8$, aber die Säurespaltung ergibt keine echte Strophantobiose, vielmehr eine Biose mit einem anderen Zucker Sarmentose, die ein Isomeres der Cymarose ist (§ 361). Das Genin ist Sarmentogenin $C_{23}H_{34}O_5$, isomer mit Gitoxigenin.

Wieder anders liegen die Dinge bei *Str. eminii*, doch sind sie noch nicht ganz aufgeklärt

---

107) ***W. A. Jacobs***, Chem. of the cardiac glucosides. Physiol. Rev., **13**, 222 (1933). S.A. — 108) ***W. A. Jacobs, A. Hoffmann***, K-Strophantin β etc. Jl. of Biol. Chem., **69**, 153 (1926). S.A. — 109) ***Dies.***, Hispidus-Stroph. ebd. **79**, 531 (1928). — 110) ***W. A. Jacobs***, Allocymarin etc. ebd. **88**, 519 (1930). — 111) ***W. A. Jacobs, M. Heidelberger***, Sarmentocymarin. Jl. of Biol. Chem., **81**, 765 (1929).

(107). Es findet sich ein Monosid und ein Biosid, das Genin ist Periplogenin oder ein nahe verwandtes. Zucker im Monosid ist Digitalose $C_7H_{14}O_5$ oder ein Isomeres. Im Biosid ist anscheinend wieder Glucose an diesen Zucker geheftet. Digitalose ist ebenfalls einer der Zucker aus den Glykosiden der *Digitalis*, enthalten in den Präparaten von „Digitalinum verum" (§ 361).

Das eben genannte Periplogenin ist das Genin der Glykoside aus *Periploca graeca, Asclepiadaceae*. Das Genin $C_{23}H_{34}O_5$ ist isomer mit Sarmentogenin und Gitoxigenin. Es ist wieder in derselben Art gebunden. Das genuine **Periplocin** enthält wieder Glucose, die durch Strophantobiase abspaltbar ist; als sekundäres Glykosid entsteht dann **Periplocymarin**, ein Heterosid des Genins mit Cymarose **(112)**. Das Enzym kommt nach SOLACOLU **113)** auch in *Periploca* selbst vor.

Bei verschiedenen anderen Glykosiden dieser Gruppe scheinen die Verhältnisse ganz ähnlich zu liegen. So enthält *Apocynum cannabinum* ein Cymarin, das aber anscheinend nicht Cymarose, sondern einen anderen isomeren Zucker hat; Ouabain liefert dagegen Rhamnose, ebenso eines der Glykoside von *Antiaris toxicaria*, ein anderes daraus einen damit isomeren Zucker, Antiarose. Da genauere enzymatische Befunde nicht vorliegen, sei hier nicht weiter darauf eingegangen, vgl. bei JACOBS **107)**.

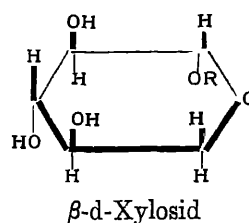
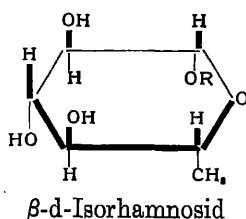
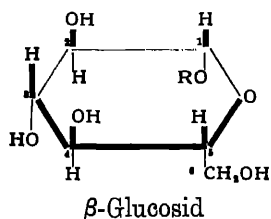
Endlich gehört allem Anschein nach die Spaltung des **Oleandrins** hierher. Die Chemie und Zerlegung der Glykoside aus *Nerium Oleander* ist noch nicht abgeschlossen. Es sind unter den Namen Neriin und Oleandrin verschiedene Glykoside beschrieben worden. Fest steht seit WINDAUS (1925), daß als Genin Digitaligenin erhalten werden kann, der Zucker war nicht sichergestellt. Die enzymatische Spaltung hat neuerdings TANRET (l. c. 49) an „Neriin" und „Oleandrin" untersucht mit dem Ergebnis, das beide langsam durch Mandelemulsin, schnell durch Saft von *Helix* gespalten werden. Dabei soll neben Glucose ein nicht identifizirter Zucker, der keine Pentose ist, freigesetzt werden. Versuche mit arteigenem Enzym liegen nicht vor. Anscheinend entstehen dabei nun auch sekundäre Glykoside, von denen nunmehr FLURY **113a)** eins völlig rein dargestellt hat. Dies **Folinerin** $C_{29}H_{46}O_8$ liefert bei der Säurespaltung ein Genin Oleandrigenin, das durch Abspaltung von 3 H_2O in Digitaligenin übergeht. Der Zucker ist noch nicht gesichert, nach seiner Formel $C_6H_{12}O_3$ ist er vielleicht ein niederes Homologes der Cymarose (Priv. Mitt.) (§ 361).

b) Synthetische β-Heteroside.

§ 343. Die Spezifität der Hetero-glucosidase richtet sich natürlich zunächst auf synthetische Glucoside. Aber sie bedarf nunmehr einer ganz generellen Erweiterung. Man weiß seit langem, daß auch vereinzelt Heteroside anderer Zucker, so der Isorhamnose, spaltbar sind. EMIL FISCHER (H. W. S. 634, *l. c. 834*), der diese Beobachtung machte, hat auch in diesem Falle bereits darauf hingewiesen, daß hier eine ausgesprochene Verwandtschaft in der Konfiguration beider Zucker vorliegt. Aber er fand andere Zucker, für die etwa das Gleiche gilt, in ihren Heterosiden unspaltbar, so besonders die d-Xyloside (die man s. Z. als l-Xyloside schrieb). Erst die systematischen Untersuchungen von HELFERICH haben gezeigt, daß jedenfalls die absolute Spezifität von der Konfiguration beherrscht wird: es sind alle Heteroside spaltbar, in denen die Konfiguration der β-d-Glucose erhalten geblieben ist. Dies sind von Zuckern eben Isorhamnose und d-Xylose, wie aus folgenden Formelbildern für die Heteroside hervorgeht (R = Aglucon):

---

112) ***W. A. Jacobs, A. Hoffmann,*** Periplocymarin etc. Jl. of Biol. Chem., **79,** 519 (1928). — 113) ***Th. Solacolu, G. Herrmann,*** Nouv. gluc. et ... diast. hydrol. dans ... Periploca. Soc. Biol. **117,** 1138 (1934); BPh **85,** 533. — 113a) ***F. Flury, W. Neumann,*** Folinerin. Klin. Ws. **1935,** I, 562. S.A.

β-Glucosid β-d-Isorhamnosid β-d-Xylosid

Auch β-Methyl-maltosid wird in Methanol + Maltose zerlegt. Freilich, die relative Spezifität, d. h. die Geschwindigkeit der Spaltung, kann durch Änderungen der Struktur bei gleicher Konfiguration sehr stark abnehmen, so daß die ältere Methodik die Spaltung der d-Xyloside übersehen konnte. Sie ist auch nur dann deutlich, wenn man anstelle der Methylxyloside die Phenolxyloside verwendet, wie dies HELFERICH auch in anderen Fällen mit Erfolg getan hat. Ebenso nimmt die relative Spezifität ab, wenn man andere Strukturänderungen an der Glucose durchführt, z. B. die endständige OH-Gruppe bromirt oder methylirt. Dies also ist das Feld der systematischen Untersuchungen an synthetischen Heterosiden. Ob auch die Änderung der Konfiguration in C 4, also der Übergang in Galactoside, nur die relative oder auch die absolute Spezifität ändert, ob also Galactosidase = Glucosidase ist, haben wir § 332 eingehend erörtert: HELFERICH selbst scheint jetzt eine Verschiedenheit beider Enzyme anzunehmen; wir kommen hier darauf nicht mehr zurück.

Völlig unspaltbar sind demzufolge die durch absolute Spezifität getrennten Heteroside. Sehen wir also nunmehr von den β-Galactosiden ab, so sind demgemäß unspaltbar alle Mannoside, alle Fructoside, ferner α-Galactoside, α-Glucoside, β-l-Arabinoside, α-l-Rhamnoside. Als völlig unspaltbar erwies sich demnach auch der Monomethyl-äther des Zymophosphats sowohl in der α-- wie in der β-Form (Methyl-fructofuranose-di-PhS) (MORGAN **114)**). Selbst bei gleicher Struktur ist also überall die Konfiguration maßgebend. Die reinen Strukturänderungen der Glucose selbst geben verschiedene Resultate (s. u.), eine absolute Verhinderung der Spaltung bewirkt z. B. Methylirung in C 3 (HELFERICH **124)**).

In den natürlichen Heterosiden kommt noch l-Rhamnose vor, die aber mit der d-Isorhamnose und ihren spaltbaren Heterosiden nicht verwandt ist. Sie hängt vielmehr mit der l-Isorhamnose zusammen, indem diese durch Umkehrung der Konfiguration an C 2 aus ihr entsteht, wie ebenso d-Rhamnose und d-Isorhamnose. (Formeln H. W. S. 634). VOTOČEK **115)** hat d-Rhamnose aus d-Isorhamnose (Isorhodeose) durch diese Umlagerung dargestellt. Die natürlichen l-Rhamnoside werden nun bisher sämtlich als unspaltbar angegeben (§§ 342a, 361); die synthetischen Heteroside sind noch kaum untersucht. Ich finde nur Angaben von ROBERTSON **137)**, daß Emulsin das Rhamnosid des Methylsalicylats überhaupt nicht angreift, und von HELFERICH **127)**, daß Phenol-β-l-rhamnosid von Mandel-emulsin ganz schwach, nahe an der Fehlergrenze gespalten wird.

Es seien nun noch die seitdem untersuchten Heteroside halbwegs systematisch gruppirt aufgeführt. Da es sich immer um β-Glucoside handelt, wird dies „β" nunmehr weggelassen.

2-Glycerol-glucosid: Synthese aus 1,3-Benzyliden-glycerol + Acetobrom-glucose

114) ***W. Th. J. Morgan,*** α- and β-Methylhexoside-diphosph. acid. Biochem. Jl., **21**, 675 (1927). S.A. — 115) ***E. Votoček, F. Valentin,*** Sur l'inverse opt. du rhamnose naturel etc. C. R., **183**, 62 (1926).

(CARTER 116)). Benzoylirte Glucose ist enthalten im natürlichen Glykosid Populin, gebunden an Saligenin (§ 341). Dieses Gl. wird sehr leicht durch Taka gespalten, wobei auch etwas freie Benzoesäure entsteht (KITASATO 117)).

Glykoside der Glucose.

Neue Methode zur Herstellung von Phenolglucosiden SCHMITZ-HILLEBRECHT 118).

Permethylirte Zucker wie Tetramethyl-methylglucosid, Heptamethyl-lactosid sind unspaltbar (KUHN 119)).

Substitution in 6: Methyl-glucosid-6-bromhydrin ist nach EMIL FISCHER (H. W. S. 602) unspaltbar, dagegen ist auch hier das entsprechende Phenol-derivat langsam spaltbar, etwas schneller als das nahe verwandte Xylosid (s. u.). Bei einem Präparat war z. B. das Wertigkeitsverhältnis der Spaltung Salicin: Bromhydrin : Xylosid 9,4 : 0,08 : 0,017 (**124**). Analog macht Verätherung in 6 wieder das Methylderivat - - - CHOH · CH_3 des Methylglucosids unspaltbar (**121**, **122**), dasselbe des Phenol-glucosids wird langsam zerlegt (**133**).

Desoxy-methyl-glucosid ist nach älteren Angaben (BERGMANN) unspaltbar; das analoge Phenolderivat hat HELFERICH 129) nicht darstellen können, das α ist durch Mannosidase spaltbar. — Methylirung an C 3 macht unspaltbar (**124**).

Eine Reihe von am Zucker acetylirten, benzoylirten, toluolsulfonirten etc. Phenolglucosiden hat HELFERICH 136) dargestellt; sie sind meist spaltbar, nur die letztere Substitution scheint unspaltbar zu machen.

Leichte **Veränderungen am Benzolkern** der Phenolglucoside haben erheblichen Einfluß auf die Spaltbarkeit. Bei Kresol-glucosiden macht die para-Substitution nichts aus, wohl aber sind die ortho-Derivate (auch bei Galactosiden) viel schneller spaltbar. m-Derivate stehen in der Mitte (**135**, II). o-Kresol-glucosid ist schneller spaltbar als Salicin (**131**). Auch o, o'-Xylenol-gluc. wird sehr schnell gespalten. Ebenso wirkt die Einführung einer Ortho-methylgruppe in p-Kresol-gluc. genau so verstärkend wie bei Einführung des Ortho-Methyls in Phenolgluc. selbst. (Phenol resp. p-Kresol: o-Kresol resp. o, p-Xylenol wie 1 : 18) (**136a**). Aethyl wirkt in o-Stellung wenig fördernd, in para hemmt es. Carboxyl in ortho hemmt, aber nicht so stark wie eine Aminogruppe (s. u.), Veresterung des Carboxyls verstärkt die Hemmung (**136a**) Eine Reihe weiterer Benzol-derivate s. Tab. Besonders leicht spaltbar ist das Glucosid des Vanillins.

---

116) ***N. M. Carter***, Synth. des 2-Glyceringlucos. Ber. Chem. Ges., **63**, 1684 (1930). S.A. — 117) ***T. Kitasato***, Part. Hydrol. des Populins etc. Bioch. Zs. **190**, 109 (1927). — 118) ***E. Schmitz-Hillebrecht***, Darst. von Phenolgluc. Diss. Leipzig 1933; BPh **79**, 25. — 119) ***R. Kuhn, H. H. Schlubach***, Verhalten permethyl. Zucker gegen Emulsin. Zs. phys. Chem., **148**, 154 (1925). — 120) ***B. Helferich, J. Becker***, Synth. eines Disacch.-Glucosids. Ann. Chem. Pharmac. (LIEBIG), **440**, 1 (1924). — 121) ***B. Helferich c.s.***, Spezif. der α-Glucosidase aus Hefe. Ber. Chem. Ges., **59**, 79 (1926). — 122) ***B. Helferich, E. Günther***, Deriv. des d-Glucose-6-methyläthers. Ber. Chem. Ges., **64**, 1276 (1931). — 123) ***B. Helferich, H. Appel***, Emulsin VI. Zs. phys. Chem., **205**, 231 (243) (1932). S.A. — 124) ***B. Helferich c.s.***, Emulsin VII. ebd. **208**, 91 (1932). S.A. — 125) ***B. Helferich, H. Appel, R. Gootz***, Emulsin X. ebd. **215**, 277 (1933). S.A. — 126) ***B. Helferich, O. Lang***, Emulsin XI. Zs. phys. Chem., **216**, 123 (1933). S.A. — 127) ***B. Helferich, H. Rohr, E. Günther***, Emulsin XII, Spalt. von Phenolisorhamnos. ebd. **221**, 90 (1933). S.A. — 128) ***B. Helferich, G. Sparmberg***, Spalt. von d-Glucuroniden. ebd. **221**, 92 (1933). S.A. — 129) ***B. Helferich, A. Iloff***, Emulsin XIII, Ferm. Spalt. v. Glykos. des Acetylglucosamin. Zs. phys. Chem., **221**, 252 (1933). S.A. — 130) ***B. Helferich, O. Peters***, Glucos. von p-Nitrophenol und p-Aminophenol etc. Jl. für prakt. Chem., **138**, 281 (1933). S.A. — 131) ***B. Helferich, H. E. Scheiber***, Emulsin XV, Spalt. von Kresolglucos. etc. Zs. phys. Chem., **226**, 272 (1934). S.A. — 132) ***B. Helferich, U. Lampert***, Emulsin XVI, Spaltung von d-Xylosiden etc. Ber. Chem. Ges., **67**, 1667 (1934). S.A. — 133) ***B. Helferich, E. Günther***, Spaltb. des Phenol-d-glucosid-6-methyläther. Zs. phys. Chem., **231**, 62 (1934). S.A. — 134) ***B. Helferich, A. Iloff, H. Streeck***, Ferm. Spalt. von Aminoglykos. ebd. **226**, 258 (1934). S.A. — 135) ***B. Helferich, E. Günther, S. Winkler, (F. Philipp)***, Darst. und Ferm. Spalt., bas. Glykos. I, II. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **508**, 192; **514**, 228 (1934). S.A. — 136) ***B. Helferich, F. Strauss***, Deriv. der Phenolglucoside. Jl. für Prakt. Chem., **142**, 13 (1935). S.A. — 136a) ***B. Helferich, H. E. Scheiber, R. Streeck, F. Vorsatz***, Emulsin XXI. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **518**, 211 (1935) S.A.

Spaltbarkeit einiger aromatischer Glucoside nach **136a).**

Nr.	Substrat	Wertigkeit	*k* (ln) d. Säurespaltung
	β-d-Glucosid von		
1	Phenol	0,34	0,0023
2	o-Cyanmethyl-phenol	2,0	0,00049
3	p-Cyanmethyl-phenol	1,2	0,0016
4	o-Oxy-acetophenon	3,3	0,011
5	p-Oxy-acetophenon	1,1	0,0008
6	o-Oxy-benzaldehyd (Helicin)	8,6	0,0009
7	p-Oxy-benzaldehyd	4,2	0,0008
8	Kaffee-säure	8,4	0,0026*
9	Protocatechualdehyd (Zucker am p-Hydroxyl	10	0,0013
10	Isovanillin	11	0,0043
11	Vanillin	13	0,0035
12	Isobourbonal (Äthoxy statt Methoxy beim Isovanillin)	2,5	

*) Die Substrat-Konzentration war nur ein Drittel von der der anderen Spaltungsversuche.

Aus dieser Tabelle ergeben sich folgende Regelmäßigkeiten:

Die Spaltungen durch Säure (n-HCl, gleiche Substrat-konzentration wie bei den Fermentspaltungen) gehen nicht mit den Spaltungen durch Ferment parallel. Ein auf die Fermentspaltung spezifisch wirkender Einfluß der Substitution im Benzolkern des Aglucons muß auch hier vorhanden sein. Bei den einfach substituirten Glucosiden ist die CH_2 . CN-Gruppe, die CO . CH_3-Gruppe und die CO . H-Gruppe in steigendem Maße für die Spaltung förderlich. In o-Stellung ist der günstige Einfluß stärker als in p-Stellung.

Glykoside verwandter Zucker. Von den konfigurativ der d-Glucose entsprechenden Zuckern hatte bereits Emil Fischer das Methyl-d-isorhamnosid als spaltbar befunden und hielt dies für eine Ausnahme, da er die Xyloside als unspaltbar fand (s. o.). Helferich zeigte, daß Methylxylosid zwar schwer, aber doch spaltbar ist **(123)**; leichter auch hier das Phenolxylosid **(124, 133)**, noch leichter die Kresolxyloside, davon wieder am leichtesten die Orthoverbindung **(132)**; etwa 15 mal schneller als Phenol-xylosid. Das Verhältnis zu den entspr. Glucosiden ist immer ca. 1 : 140.

Robertson **137)** fand das Xylosid des Methyl-salicylats teilweise spaltbar. Bei den **d-Iso-rhamnosiden** wird wieder das Phenolderivat schneller gespalten als das Methylderivat; sogar schneller als das Glucosid **(127)**. Die **Rhamnoside** gelten als unspaltbar; Helferich **127)** fand beim Phenol-l-rhamnosid eine sehr schwache, kaum die Fehlergrenze übersteigende Spaltung, Robertson **137)** bei dem Rhamnosid des Methylsalicylats garkeine Spaltung. Glykoside der **d-Glucuronsäure** werden durch ein besonderes Enzym im Emulsin gespalten **(128)** (Näh. § 362).

Biose-glykoside. Methylmaltosid wird, wie schon Fischer fand, in Maltose und Methanol zerlegt; nach Petersen **138)** wirkt aber Emulsin nur langsam (besondere β-Maltosidase?, vgl. § 299).

β-Phenol-gentiobiosid wird mit gleicher Geschwindigkeit an beiden β-Stellen zerlegt, so daß keine Gentiobiose auftritt (Schmitz-Hillebrecht **118)**). Dagegen wird α-Methylgentiobiosid normal zerlegt in β-Glucose und α-Methylglucosid **(120)**.

Zur Übersicht der Arbeiten Helferich's c.s. sei hier eine Tabelle wiedergegeben **(124)**,

---

137) ***A. Robertson, R. B. Waters,*** Synth. of monotropitoside. Jl. of Chem. Soc. **1931,** 1881. — 138) ***S. R. Petersen,*** Ferm. Spalt. von Disacch.- Glykos. Verh. Sächs. Akad. Leipzig, **85,** 154 (1933). S.A.

welche alle bis dahin untersuchten Substrate der Wirkung des Mandel-emulsins mit den relativen Werten ihrer Spaltbarkeit aufführt.

Reihenfolge der Spaltbarkeit durch Mandel-emulsin nach HELFERICH **124)**

Substrat	Wertigkeit	Zeit für 50%ige Spaltung	Bemerkungen
Salicin	2000	0,0005 Tage	(0,72 Min.)
β-Phenol-d-glucosid	200	0,005 „	(7,2 „)
β-Methyl-d-glucosid	(25)	0,04 „	(58 „)
β-Phenol-d-galaktosid	20	0,05 „	(72 „)
α-Phenol-d-galaktosid	3,5	0,29 „	
β-Phenol-d-xylosid	3,3	0,30 „	
β-Phenol-d-glucosid-6-bromhydrin	3,2	0,30 „	
α-Äthyl-l-arabinosid	0,9	1,1 „	
Trehalose	0,3	3,3 „	
α-Methyl-d-mannosid	(0,08)	(12,5) „	(nach den Angaben von HÉRISSEY)
β-Äthyl-l-arabinosid	0,06	17 „	
β-Methyl-d-xylosid	0,02	50 „	
α-Phenol-d-glucosid	0,001	1000 „	

Glykoside von Aminozuckern. Phenolglucosaminid wird nicht gespalten **(134)**, wohl aber Phenol-6-amino-glucosid; deckt man die hemmende basische Gruppe (s. u.) durch Acetyl ab, so tritt (beim N-Acetyl-6-amino-glucosid) die Spaltung viel schneller ein. Dies gilt nun auch für das Acetylderivat des Phenol-glucosaminids selbst **(129)**, auch GRASSMANN c.s. **139)**, **140)** haben die Spaltbarkeit von glucosidischen Abkömmlingen dieses N-Acetyl-glucosamins beobachtet. Es ist nämlich ein Baustein des Chitins. Hier hört nun aber die Spezifität der eigtl. Glucosidase auf: die Spaltung dieser Glykoside des Glucosamins geschieht durch ein eigenes Ferment, das nach HELFERICH **129)** weder mit Glucosidase noch mit Mannosidase parallele Wirkungsverschiebungen beim Reinigen des Rohferments zeigt. Es ist wahrscheinlich die „**Chitinase**" selbst, die auch außer diesen Glucosaminiden noch andere einfachere niedermolekulare Abbaustufen des Chitins, die Chitodextrine, zerlegt. Diese Chitinase ist also ein eigenes im Emulsin vorhandenes Enzym, das außer dem Polysaccharid selbst auch noch seine Abbaustufen und verwandte Stoffe angreift. Wir kommen darauf im X. H. T. zurück.

Glucoside mit stärker abgewandelten Agluconen. Glucoside von p-Nitrophenol und verschiedenen Aminophenolen sind spaltbar (HELFERICH **130, 135**). Die basischen Aminophenol-glykoside werden langsamer zerlegt, da immer die basische Gruppe hemmt.

Dargestellt sind außer p-Aminophenolglucosid selbst die der o- und p-Aminomethylphenole, sowie deren N-Acetyl-derivate. Ortho werden schneller zerlegt als para, beide schneller als die entsprechenden Galactoside, aber das Verhältnis bleibt auch hier bei beiden Arten Glykosiden gleich (§§ 299, 332). Stets wird die Hemmung durch die basische Gruppe vermindert, wenn man acetylirt. Meta-Verbindungen werden noch schneller gespalten als o- und p-; auch hier steigert Acetylirung auf das Dreifache **(135**, II).

---

139) ***L. Zechmeister, W. Grassmann, G. Tóth, R. Bender,*** Verknüpfungsart der Glucosaminreste im Chitin. Ber. Chem. Ges., **65**, 1706 (1932). — 140) ***W. Grassmann, L. Zechmeister c.s.,*** Chitinspalt. durch Emuls. Ber. Chem. Ges., **67**, 1 (1934).

o-[N-Acetamino-methyl]-phenol......	0,88
m-[N-Acetamino-methyl]-phenol......	1,48
p-[N-Acetamino-methyl]-phenol......	0,13
o-[Amino-methyl]-phenol	0,036
m-[Amino-methyl]-phenol	0,05
p-[Amino-methyl]-phenol	0,027

Emulsin-spaltbare Glykoside des p-Amino-phenols mit Biosen (Maltose, Lactose, Cellobiose, Gentiobiose) haben BABERS c.s. 141) dargestellt aus den Acetobrom-zuckern mit Nitrophenol und Reduktion.

Am Benzolkern in 5 durch Halogen (Chlor, Brom, Jod) substituirte Salicylglucoside hat DELAUNEY 142) dargestellt und spaltbar befunden. d-Menthol-glucosid und d-l-Borneol-glucosid sind spaltbar; beim letzteren tritt nach NEUBERG c.s. 143) **asymmetrische Spaltung** ein, indem erst l-Borneol frei wird.

Die schnellere Spaltung des l-Borneolglucosids hatte bereits MITCHELL 144) angegeben. MITCHELL 145) fand eine weitere asymm. Spaltung beim Glucosid des Menthyl-n-hexyl-carbinol. Hier wird die d-Form 8,4 mal schneller zerlegt als l-. Mit einer ganz anderen Methode fand dann MITCHELL 146) hier wieder fast genau denselben Wert für $k_d : k_l$ (8,6), indem er ohne Trennung der beiden Komponenten den Ablauf der Reaktion mathematisch verfolgte, durch Aufstellung von Exponentialformeln. VEIBEL 147) fand eine Bevorzugung der d-Komponente beim Glucosid des 3-Methyl-pentanols, und noch stärker beim 1-Methyl-pentanol ($k_d : k_l = 3{,}44$).

Heterocyclische Glykoside. Glucoside von Pyrimidinen werden nach HAHN 150) von Emulsin gespalten, und zwar vom 2-Äthyl-mercapto-6-oxypyrimidin, Isocytosin und Methyl-isocytosin. Diese Spaltbarkeit weist auf Übergänge zu den ja wohl an sich spezifischen Enzymen hin, welche die Purin-heteroside der Ribose spalten, den Nucleosidasen. Synthetische Purin-glucoside fand EMIL FISCHER unspaltbar, wohl aber kommen natürliche spaltbare Glucoside von Coffein und Theobromin vor, die seither nicht wieder untersucht sind. (H. W. S. 634).

2) Cyanogene Spaltungen.

a) Amygdalin und ähnliche Spaltungen.

§ 344. Zur Strukturfrage des Amygdalins sei nur rekapitulirt, daß es als Zucker Gentiobiose = Amygdalose enthält, als Aglucon Benzaldehyd-Cyanhydrin. Durch Einwirkung des Ferments „Amygdalase", das eine Abart der Gentiobiase ist, zerfällt der Gentiobiose-kern und es resultirt das einfache β-Glucosid des Aglucons, das Emil FISCHER Mandelnitril-glucosid, ARMSTRONG **Prunasin** genannt hat. Für das Amygdalin hatte deshalb BOURQUELOT (*l. c. 585*) den systematisirenden Namen Gluco-prunasin vorgeschlagen, der sich aber nicht eingeführt hat.

Das einfache Glucosid Prunasin kommt auch natürlich vor; es wurde zunächst nur in Arten von *Prunus* gefunden (H. W. S. 606); indessen hat es RABATÉ 151) auch in dem

---

141) ***F. H. Babers, W. F. Goebel,*** Synth. of the p-aminophenol glyc. Jl. of Biol. Chem., **105**, 473 (1934). — 142) ***P. Delauney,*** Synth. bioch. du 5-bromo-(chloro-)salicylgluc. C. R., **183**, 90; **185**, 1530; **191**, 57; **197**, 70 (1926—1933). — 143) ***C. Neuberg, K. P. Jacobsohn, J. Wagner,*** Bild. und Spalt. von Glucosiden. Fermentforsch., **10**, 491 (1929). — 144) ***St. Mitchell,*** Hydrol. of d-gluc. of d- and l-borneol. Jl. of Chem. Soc., **127**, 208 (1925). — 145) ***St. Mitchell,*** Hydrol. of the d-gluc. of l-methyl-n-hexylcarbinol. Jl. of Biol. Chem., **82**, 727 (1929). — 146) ***St. Mitchell, J. Mc. Arthur,*** Expon. anal. appl. to the asymm. hydrol. of some gluc. with emulsin. Jl. of Chem. Soc., **1932**, 1669. — 147) ***St. Veibel, E. Bach,*** Emulsinwirkung. Bioch. Zs., **252**, 401 (1932). — 148) ***St. Veibel,*** Action of emulsin II. Biochem. Jl., **28**, 1733 (1934); BPh **85**, 409. — 150) ***A. Hahn, W. Laves,*** Synth. Glyk. von Pyrimidinen. Zs. Biol., **85**, 280 (1926). — 151) ***J. Rabaté,*** Et. bioch. du pêcher Persica. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 385 (1933); BPh **74**, 447.

Pfirsich, *Persica vulgaris*, nachgewiesen. Neben dieser l-Form des Glucosido-mandelonitrils findet sich in der Natur auch die d-Form, Sambunigrin, in *Sambucus* und *Viburnum* (H. W. S. 606), ebenso die d, l-Form Prulaurasin in den Blättern, nicht den Samen von *Laurocerasus* (*l. c. 587*). Neuere Angaben über das Vorkommen dieser beiden Glykoside habe ich nicht gefunden. Methodisches zur quantitativen Bestimmung von Prulaurasin in den Blättern auf grund des entstehenden HCN bei BISHOP **152)**.

Methodisches zur Gewinnung von Amygdalin aus bitteren Mandeln BRIDEL **153)**: schnelle Perkolation mit 70 %-igem Alkohol; Ausbeute 30 g. je Kilo Mandeln, der Rückstand ist geeignet zur Darstellung von Emulsin-präparaten.

Diese Konfigurationsbezeichnung der beiden Stereomeren richtete sich bisher nach dem rein äußerlichen Merkmal, welche Drehung die bei der Verseifung der Nitrile erhaltene Mandelsäure zeigt; denn die Glucoside selbst drehen wie alle β-Glucoside links. Die wahre Konfiguration der Mandelsäure war damit aber noch nicht gegeben und damit auch nicht die der beiden Glucoside. Diese festzustellen ist erst im Zuge der modernen Arbeiten zur Ermittlung der sterischen Zusammenhänge FREUDENBERG c.s. **154)** gelungen auf grund der Beziehungen der Mandelsäure zu anderen Oxysäuren und der optischen Daten ihrer Derivate. Danach gehört die linksdrehende Mandelsäure zur d-Reihe, wie die linksdrehende Milchsäure; sie ist also zu schreiben: d(—)-Mandelsäure. Daraus folgt also für Prunasin die korrekte Schreibform: d (—)-Glucosido-mandelonitril, für Sambunigrin entsprechend l(—)-Glucosido-mandelonitril. Mit anderer Methode bestätigt von LUTZ **155)**.

Durch KOH erfolgt eine „Racemisirung", d. h. es entsteht aus dem an sich immer linksdrehend bleibenden Glykosid ein Gemisch, aus dem bei der Spaltung eine rechtsdrehende Mandelsäure erhalten wird. Bestätigung und Weiterführung älterer Angaben (*l. c. 588, 589*) durch SMITH **156)**. Das voll racemisirte Amygdalin dreht $[\alpha]_D = -50{,}2°$; bei Anwendung von alkoh. KOH entsteht eine stark rechtsdrehende Mandelsäure.

Die schon von AULD und ARMSTRONG (*l. c. 590, 591*) begründete Annahme, daß der Prozeß der Spaltung mit der Abspaltung einer Glucose aus der Amygdalose beginnt, ist von ROSENTHALER **157)** erneut bestätigt worden, zum mindesten als Hauptvorgang. Bei kurzen Versuchen entsteht mehr Glucose, als zu erwarten wäre, wenn erst Gentiobiose und aus dieser erst Glucose entstünde. Wie wir § 342a gesehen haben, ist dieser Ablauf, die primäre Biose-Spaltung, bei allen biosidischen Heterosiden die Regel.

Daß außer der asymmetrischen Synthese (§ 345) auch eine **asymmetrische Spaltung** von d, l-Mandelonitril durch Emulsin möglich ist (ROSENTHALER (*l. c. 597*) **158)**) haben ALBERS c.s. (l. c. 162/3) bestätigt, bei Einwirkung von Emulsin auf d, l-Mandelonitril bleibt (—)-Mandelonitril zurück. Zum Abfangen der entstehenden Säure wendet R. $NiCO_3$ an.

b) Reversion der Wirkung.

§ 345. Die einfachen Reversionssynthesen der β-Glucosidase sowohl von Holosiden wie von Heterosiden sind § 304 behandelt. Sie bieten an sich keine enzymtypischen

---

152) ***L. R. Bishop,*** Estim. of cyanog. glucos. Biochem. Jl., **21,** 1162 (1927). — 153) ***M. Bridel, M. Desmarest,*** Proc. permett. d'extraire, du tourteau d'amande amère, l'amygdaloside etc. C. R., **185,** 1514 (1927). — 154) ***K. Freudenberg, F. Brauns, H. Siegel,*** Konfig. der Mandelsäure. Ber. Chem. Ges., **56,** 193 (1923). — 155) ***O. Lutz,*** Konfig. der Mandelsäure. ebd. **65,** 1609 (1932). — 156) ***J. A. Smith,*** Asymm. katalyt. Racem. von Amygdalin. Ber. Chem. Ges., **64,** 1115 (1931). — 157) ***L. Rosenthaler,*** Einwirk. von Emulsin auf Amygd. Arch. der Pharmac., **263,** 563 (1925). S.A. — 158) ***Ders.,*** Asymmetrasewirk. d. Emuls. Bioch. Zs., **271,** 439 (1934). S.A.

Probleme; die Natur der aus Glucose entstehenden Biosen ist freilich immer noch nicht sicher aufgeklärt (§ 334).

Um so interessantere theoretische Probleme bietet immer noch die **asymmetrische Synthese der Oxynitrile,** über die volles Licht noch nicht ausgebreitet ist. Immerhin sind die Hauptpunkte einigermaßen widerspruchsfrei geklärt, indem die grundsätzliche Deutung von KRIEBLE u. WILAND (*l. c. 627*) allgemein angenommen ist. (NORDEFELDT **159)**), ROSENTHALER **160), 161)**, ALBERS c.s. **162), 163)**).

Danach verlaufen hier zwei ganz verschiedene und verschieden beeinflußbare Vorgänge: erstens eine unspezifische Reaktion einer Anlagerung von HCN an den Aldehyd, eine symmetrische Synthese. Dies ist eine bimolekulare Stufenreaktion (s. u.): zuerst vereinigen sich Cyan-ionen mit dem Aldehyd, und dann H-Ionen mit den zuerst gebildeten Oxynitril-ionen. Die erste Reaktion bestimmt die Geschwindigkeit des Gesamtvorganges; die Geschwind. Konst. ist unabhängig vom ph **(162)**.

Es handelt sich also nur um die Frage, wie der andere Vorgang verläuft, der die asymmetrische Synthese bewirkt, eine spezifische Katalyse, die „rechtsorientirt" ist und somit einen Überschuß von d (+)-Benzaldehyd-cyanhydrin liefert. Dieser Vorgang ist entgegen einer Anzweifelung von WEIDENHAGEN sicherlich eine spezifische Enzym-katalyse und abhängig von der h.

Aber auch nach Annahme dieses Grundprinzipes bleiben noch mehrere wesentliche Fragen offen: erstens, ob diese asymmetrische Synthese durch eine ganz besondere Synthease bewirkt wird, oder durch dasselbe Enzym, das auch die Spaltung der Oxynitrile katalysirt. Und zweitens, ob dieses Enzym, gleichgiltig ob ein besonderes oder nicht, nur die Asymmetrie als solche herstellt oder auch auf die Synthese an sich beschleunigend wirkt. Diesen verschiedenen Deutungen entspricht auch eine verschiedene Benennung. NORDEFELDT (*l. c. 623*) hatte das Enzym zuerst Oxynitrilese genannt, weil er es für eine eigene Synthease hielt, ROSENTHALER (*l. c. 621*) dagegen **Asymmetrase**, weil er dem Enzym nur die Rolle zuschrieb, die Asymmetrie aufrecht zu erhalten, nicht aber die Synthese an sich zu beschleunigen. Es sollte also den an sich verlaufenden unspezifischen Prozeß nur eben in eine optische Richtung lenken. Später hat sich dann auch NORDEFELDT **159)** dieser Deutung angeschlossen. Er sagt, daß der einzige Effekt des enzymatischen Katalysators die optische Aktivität des Oxynitrils ist. Eine Beschleunigung der Synthese sollte der Katalysator dagegen nicht bewirken.

Damit war also zunächst dahingehend Einigkeit erzielt, daß hier keine besondere Synthease, keine Oxynitrilese im strengsten Wortsinne, vorhanden ist, sondern daß Oxynitrilase auch das Enzym der Synthese ist. Nachdem dies geklärt ist, steht nichts im Wege, den kurzen Namen Oxynitrilese weiter zu benutzen, um den Vorgang zu beschreiben, wie man dies ja auch bei „Phosphatese" tut. Die Frage ist aber noch nicht klar in dem Punkte, ob wirklich nur eine „Asymmetrase" gegeben ist, oder ob das Enzym nicht auch an der Synthese selbst als Katalysator teilnimmt. Im Gegensatz zu NORDEFELDT kommen ALBERS c.s. **162)** zu der Überzeugung, daß das Enzym an sich nicht nur die Asymmetrie herbeiführt, sondern diese asymmetrische Synthese auch maßgeblich beschleunigt, also als idealer Katalysator sowohl die Spaltung wie die Synthese wirklich befördert.

---

159) ***E. Nordefeldt,*** Vers. zur Rein. der Oxynitrilese. Bioch. Zs., **159**, 1 (1925). — 160) ***L. Rosenthaler,*** Emulsin. Bioch. Zs., **235**, 227 (1931). — 161) ***Ders.,*** Asymmetrasenwirk. des Emulsins. ebd. **271**, 439 (1934). — 162) ***H. Albers, K. Hamann;*** Synth. Wirk. des Emulsins. Bioch. Zs., **255**, **44** (1932). S.A. — 163) ***H. Albers c.s.,*** Kinetik der Oxynitrilese II—V. ebd. **269**, 14—62 (1934). S.A.

Zu diesem Stand der Sache seien nun noch Einzelheiten ergänzt. NORDEFELDT **159)** hat wie schon vor ihm ROSENTHALER versucht, die Asymmetrase chemisch von den anderen Enzymen des Emulsins zu trennen. Über die von ihm erhaltenen hochwertigen Präparate s. § 350.

Eine l-Asymmetrase existirt nicht, das Auftreten von l-Oxynitril beruht auf der asymm. Spaltung vorher gebildeten racemischen Oxynitrils (s. o.). ROSENTHALER **160), 161)** ließ die Frage offen, ob nun dies Enzym, welches das d, l-Mandelonitril asymmetrisch spaltet, identisch ist mit der „Asymmetrase", er fand keine wesentlichen Verschiebungen inbetreff Synthese und Spaltung bei verschiedenen Emulsinen. Nach ALBERS ist ja diese Frage zu gunsten einer Identität beantwortet.

Nach ROSENTHALER hemmen Phenole die enzymatische Synthese, was ALBERS bestätigt. Nach ROSENTHALER hemmt Hydrochinon bei 0,5 auf 0,5 g. Enzym (Emulsin-MERCK), Resorcin und Pyrogallol erst bei 2,5 g. Die Hemmung ist reversibel und läßt sich durch Entfernen des Phenols beseitigen.

Weitere Versuche über die **Kinetik der asymm. Nitrilbildung** haben ALBERS u. HAMANN **162), 163)** mitgeteilt. Es verlaufen zwei Prozesse nebeneinander, eine unspezifische Synthese und eine spezifisch-enzymatische; letztere bewirkt nicht nur die optische Lenkung, sondern eine maßgebliche Beschleunigung der Synthese des +-Oxynitrils an sich. Daneben beschleunigt allerdings auch das Enzym als idealer Katalysator die asymm. Spaltung (s. o.). Beide Prozesse, die symmetrische unspezifische und die enzymatisch katalysirte asymm. Synthese sind unabhängig von einander.

Beide sind bimolekulare Reaktionen zwischen dem Aldehyd-molekül und den Cyan-ionen; die Reakt.-Geschw. wird bestimmt durch die Menge der Cyanid-ionen, d. h. sie ist abhängig von der Konz. an OH-Ionen.

Von den beiden Stufen-reaktionen verläuft I langsam, II schnell.

$$\text{I.}\quad C_6H_5 \,.\, CHO + [CN]' \rightleftarrows C_6H_5 \,.\, CH{<}^{CN}_{O-}$$

$$\text{II.}\quad C_6H_5 \,.\, CH{<}^{CN}_{O-} + H^+ \rightleftarrows C_6H_5 \,.\, CH{<}^{CN}_{OH}$$

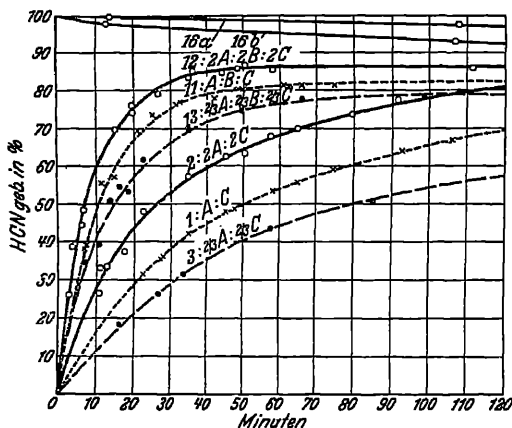
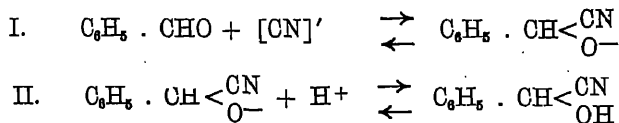



Abb. 25.

Versuch 1, 2, 3........ Synthese *ohne* Ferment
„ 11, 12, 13 .. „ *mit* „
„ 16a........ Spaltung *ohne* „
„ 16b........ „ *mit* „

Einfluß des Enzyms auf die Synthese von Oxynitril nach ALBERS und HAMANN **162)**.

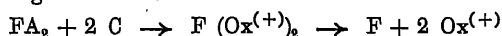
Die Asymmetrie wird ausschließlich durch das Enzym bewirkt. Bei dieser asymm. Synthese ist die Anfangsgeschwindigkeit proportional der Konz. des Enzyms. Mißt man unter bestimmten Bedingungen nach 5 Min. die Drehwerte, so kann man Einheiten festlegen. Es ist **OxE** die **Einheit der Oxynitrilese; OxW** ist der **Oxynitrilese-Wert,** gleich der Zahl der OxE in 1 mg Trockenpräparat des Fermentes. Eine OxE erzeugt nach 5 Min. eine Menge Oxynitril entspr. einer Drehung $[\alpha]^{10}_{D} = 0{,}01°$.

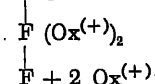
Bei Salicylaldehyd fällt die spezifische asymm. Synthese aus, es bildet sich nur inaktives Oxynitril, da die Phenolgruppe die enzymatische assymm. Synthese hemmt (s. o.). Die Begleitstoffe sind (wie bei der Saccharase) ohne Einfluß

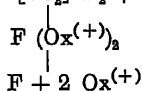
auf die Kinetik und die ph-Aktiv.-Kurven. Die Dissociationsverhältnisse der Ferment-Substrat-Verbindung sind unabhängig vom ph und von der Konz. des Substrates. Da das Enzym gleichzeitig Affinität zu der Aldehydgruppe und zum HCN zeigt, scheint es zwei Aminogruppen zu enthalten.

Die ph-Aktiv.-Kurve zeigt 3 Maxima (bei 5,4, 5,85, 6,5), die aber nicht auf verschiedene Enzyme, sondern auf Veränderungen des Substrates zu beziehen sind. Es sind nämlich in der Lösung von Benzaldehyd in 50 %-igem Alkohol Gleichgewichte vorhanden von echtem Aldehyd mit Carbonylgruppe, Orthoaldehyd $C_6H_5 . C (OH)_3$ und Acetal, die ihrerseits derart vom ph abhängig sind, daß für das Vorhandensein der — allein reagirenden — Carbonylgruppe 3 Maxima gegeben sind (Spektroskop. Messungen). Das Enzym bindet sich mit dem wahren Aldehyd zu der reaktionsfähigen Verbindung FA_2. Diese bindet überschüssigen Aldehyd zu einer wahrscheinlich nicht reagirenden Verbindung $[FA_2]A_2$. Aus dieser lockeren Verbindung verdrängt HCN den überschüssigen Aldehyd, es entsteht die eigentliche Zwischenverbindung $[FA_2]C_2$. Umgekehrt kann zuerst über $[FC_2]$ und Anlagerung von HCN zu $[FC_2]C_2$ Aldehyd HCN verdrängen, so daß $[FC_2]A_2$ entsteht. Aldehyd hat viel stärkere Affinität zum Enzym als HCN.

Die Hauptreaktion wird gedeutet als:

$$FA_2 + 2\ C \rightarrow F\ (Ox^{(+)})_2 \rightarrow F + 2\ Ox^{(+)}$$

Die Nebenreaktionen:

$$[FA_2]\ A_2 + 2\ C - [FA_2]\ C_2 + 2\ A$$
$$\downarrow$$
$$F\ (Ox^{(+)})_2$$
$$\downarrow$$
$$F + 2\ Ox^{(+)}$$

oder

$$[FC_2]\ C_2 + 2\ A = [FC_2]\ A_2 + 2$$
$$\downarrow$$
$$F\ (Ox^{(+)})_2$$
$$\downarrow$$
$$F + 2\ Ox^{(+)}$$

Die Arbeiten bringen noch eine Fülle von Einzelheiten, die aber soweit in das Gebiet der physikalischen Chemie und Kinetik des Enzyms hineinreichen, daß wir nach dem Plane dieses Ergänzungswerkes darauf nicht näher eingehen können.

c) Sonstige cyanogene Spaltungen.

§ 346. Vicianosidspaltung erfolgt durch die normale β-Glucosidase + Oxynitrilase. Es resultirt Vicianose, die durch β-Galactosidase weiter in β-Glucose + α-l-Arabinose zerlegt wird (§ 332); Aglucon ist l-Phenylglykol (*l. c. 629*).

Bei der Keimung von *Vicia* bleibt das Glykosid in den Cotyledonen; die Pflanze selbst ist bis zur Bildung der jungen Samen HCN-frei. Die Samenschale ist frei von Vicianosid. (Guérin **164)**).

Linamarase ist nach Rosenthaler (*l. c. 635*) ein besonderes Enzym. Es ist aber in der Pflanzenwelt weiter verbreitet als das Glykosid Linamarin (Phaseolunatin), wie schon im H. W. S. 611 angegeben. Linamarin ist β-Glucosido-aceton-cyanhydrin. Bei *Phaseolus lunatus* findet sich HCN im Samen wie im Blattstengel (Guérin). Linamarin und Linamarase in der Gift-pflanze *Dimorphoteca* (mehrere Species, Südafrika) Marais **165)**.

Rosenthaler **166)** prüfte die Wirkung auf zugesetztes Linamarin bei 50 Früchten und

164) ***P. Guérin,*** L'acide cyanh. chez les vesces. C. R., **190,** 512 (1930). — 165) ***J. S. C. Marais, Cl. Rimington,*** Poison. princ. of Dimorphoteca etc. (Linamarin). Ondestepoort Jl. Vet. Sci., **3,** 111 (1934); BPh **84,** 684. — 166) ***L. Rosenthaler,*** Verbreit. der Linamarase. Fermentforsch., **8,** 279 (1925). S.A.

Abgeschlossen: 30. 9. 35. Ber. Phys. 87, H. 3/4.

Samen der verschiedensten Familien (s. Tabelle), sowie einer Wurzel (*Valeriana officinalis*) und fand das Enzym nur in 3 Fällen nicht. Alle diese Pflanzen enthielten kein Linamarin. Da R. nochmals ausdrücklich betont, daß das Enzym streng spezifisch auf Linamarin allein wirkt, so ist seine Existenz in diesen Pflanzen vorläufig ein Rätsel.

Samen.	
Abies pectinata D. C. +	Hibiscus abelmoschus L. +
Acer campestre L. +	Hyoscyamus niger L. +
Allium Porrum L. +	Nigella sativa L. +
Alnus glutinosa Gaertner +	Ocimum basilicum L. +
Arachis hypogaea L. +	Paeonia off. L. +
Brassica oleracea cap. rubr. L. +	Phaseolus vulgaris L. +
Brassica oleracea gemmifera D. C. +	Pisum sativum L. —
Carpinus betulus L. +	Ribes rubrum L. +
Cucumis sativus L. +	Ricinus communis L. +
Cucurbita pepo L. +	Robinia pseudacacia L. +
Datura stramonium L. +	Salix acuminata Sm. +
Delphinium staphisagria L. +	Sinapis alba L. +
Ervum ervilia L. —	Sinapis nigra L. +
Ervum lens L. —	Strophanthus Kombe Oliver +
Fagopyrum esculentum Much. +	Tilia americana L. +

Früchte.	
Apium graveolens L. +	Lactuca sativa L. +
Avena sativa L. +	Ligustrum vulgare L. +
Cannabis sativa L. +	Panium miliaceum L. +
Carum Ajowan Benth. et Hook. +	Petroselinum sativum Hffm. +
Carum Carvi L. +	Phalaris canariensis L. +
Coriandrum sativum L. +	Secale cereale L. +
Cornus sanguinea L. +	Silybum marianum Gaertn. +
Cuminum Cyminum L. +	Triticum sativum Lmk. +
Foeniculum vulgare Miller +	Urtica dioica L. +
Helianthus annuus L. +	Zea Mays L. —
Hordeum vulgare L. +	

Verbreitung der Linamarase nach ROSENTHALER **166)**.

Lotase. Über das angeblich spezifische Enzym, welches das cyanogene Glykosid Lotusin spaltet, und über das Glykosid selbst ist inzwischen nichts weiter bekannt geworden.

Es liegen nur einige weitere Beobachtungen über HCN in Arten von *Lotus* vor. Ein cyanogenes Glykosid, wohl wieder Lotusin ist weiterhin gefunden worden in *Lotus Jolyi Battandier* (Sahara) von FOLEY **167)** und GUÉRIN **168)**. Letzterer fand es auch in weiteren Arten, sowie in Papilionaceen der Gruppe Loteen, nämlich *Tetragonolobus, Dorycnium, Bonjeania.* HCN fehlt bei *L. siliquosus* und *Tetragonolobus* in den Pflanzen, findet sich nur in den Cotyledonen junger Pflanzen. Nur bei *Lotus* selbst geht HCN aus den Cotyledonen in die Stengel über; bei den anderen Gattungen bleibt sie in den Cotyledonen.

Das cyanogene Glykosid **Karakin** (H. W. S. 607, *l. c. 620*), das sich in den Beeren von *Corynocarpus laevigata*, Neu-Seeland, findet, ist von CARRIE **169)** neu untersucht worden. Über Enzymspaltung hier keine Angaben. Säurespaltung liefert neben 1 Mol. Glucose ein Aglucon Hiptagensäure $C_3H_5O_4N$. Dieses Aglucon ist zuerst von GORTER **170)** aus einem Glykosid **Hiptagin** ebenfalls durch Säurespaltung isolirt worden, auch hier keine Angabe über Enzym-

167) ***H. Foley, L. Murso,*** Prés. d'un gluc. cyanh. dans le Lotus etc. Arch. Inst. Pasteur Algérie, **3**, 394 (1925); BPh **38**, 42. — 168) ***P. Guérin,*** Ac. cyanh. chez les lotus. C. R., **187**, 1158 (1928); **189**, 115, 1011 (1929). — 169) ***M. St. Carrie,*** Karakin etc. Jl. of Soc. Chem. Ind., **53**, 288 (1934). — 170) ***K. Gorter,*** Hiptagin. Bull. Jardin Bot. Buytenzorg, **2**, 187 (1920); Chem. Cbl. **1921**, I, 91.

spaltung. Hiptagin findet sich in *Hiptage madablota Gaertn.* Dieses gibt mit Alkali HCN ab. Bei beiden Glykosiden ist nur ein N cyanogen gebunden, ein anderes in einem Ring. Nach GORTER scheint es sich um ein Isoxazol-derivat zu handeln mit einer Seitenkette O=C-NHOH; CARRIE gibt der Hiptagensäure (Hiptagenin) eine andere Formel, gesichert ist keine. Jedenfalls scheint danach die obige Formel nur eine Minimalformel zu sein.

3) Physiologische Bedeutung der Glykoside und der Blausäure.

§ **347.** Zu dieser Frage ist nur wenig zu bemerken, da sich an der Tatsache nichts geändert hat, daß die Botaniker nicht einig sind, wozu die Glykoside da sind. Daß sie Zucker-Reservestoffe sind, und als solche am Stoffwechsel teilnehmen, wird von den meisten Autoren angenommen, und besonders die Schule BRIDEL's hat allerlei Material dazu beigetragen (s. u.). Andererseits kommt KERSTEN **170a)** neuerdings bei *Aesculus* und *Salix* zu dem Ergebnis, daß die Glykoside, insbesondere Aesculin, keine Reservestoffe sind. Aber entscheidend ist das Alles nicht, solange wir noch ebenso hilflos wie im H. W. vor der Frage stehen, wie sich denn die (bisher sehr zahlreichen) „unspaltbaren" Glykoside im Stoffwechsel verhalten.

Eine bereits im H. W. angedeutete Frage hat ein neues Gesicht bekommen. Es ist von der Schule HÉRISSEY—BRIDEL größerer Nachdruck darauf gelegt worden, daß viele Gl. Chromogene oder Chromogenträger sind; mit anderen Worten: entweder verfallen die Glykoside selbst der Pigmente bildenden Oxydation ebenso wie dies bei nicht glykosidischen Chromogenen der Fall ist, etwa den Brenzkatechin-derivaten in den Pflanzen. Einen solchen Fall hat z. B. BRIDEL **171)** beim Orobanchosid beschrieben. Oder aber, die Glykoside selbst sind beständig, aber ihre durch Emulsin gebildeten Aglucone sind Chromogene, die nach ihrer Freisetzung sich zunächst oxydiren und verfärben, weiterhin in hochpolymere Pigmente übergehen können. Ausführliches Sammelreferat über chromogene Phenol-glykoside bei BRAECKE **172)**. Wenn nun tatsächlich die intakten Glykoside gegen die Oxydasen der Pflanzenzelle resistent sind, ihre Genine aber oxydirt werden, so könnte man sich vorstellen, daß in dieser Tatsache auch wieder eine Eigenschaft der Glykoside als Reservestoffe für eben diese Chromogene beruht, insofern als eben diese Chromogene enzymatisch freigesetzt werden in dem Maße wie sie gebraucht werden.

Denn diese Chromogene und ihre Oxydation haben natürlich eine physiologische Bedeutung, wenn wir sie auch erst in Umrissen kennen. Ob die eigentliche Pigmentbildung durch Oxydasen eine Bedeutung an sich hat, davon wollen wir hier absehen, darauf kommen wir bei den Oxydasen zurück. Aber was wir dabei sehen, ist ja schließlich nichts anderes als eine Endphase, die irreversible Oxydation dieser phenolischen Stoffe zu irgend welchen endgiltigen Stufen, mögen diese nun eine Funktion haben oder nicht. Wahrscheinlich viel wichtiger sind die Stufen, die wir hier nicht sehen, nämlich die ersten noch reversiblen Stufen dieser Oxydation. Wir wissen ja heute, daß die geniale wenn auch experimentell nicht genügend gestützte Konzeption W. PALLADIN's von den „Atmungschromogenen" durch die neueste Entwicklung der Lehre von den Oxydationsfermenten grundsätzlich als eine der wichtigsten Erscheinungen der vitalen Oxydation wiederbelebt worden ist, daß „reversible Redox-

---

170a) ***G. Kersten,*** Physiol. Bedeut. der Glucoside in Aesculus etc. Planta, **21**, 677 (1934). — 171) ***M. Bridel, C. Charaux,*** Proc. du noircissem. des orobanches. Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 474 (1925). — 172) ***M. Braecke,*** La mélanogénèse chez les végétaux. Ann. Soc. Roy. Sci. Méd. et Nat. Bruxelles **1930**, 166. S.A.

Systeme" tatsächlich die wesentlichen Oxydationskatalysatoren in der lebenden Substanz sind. Solche sind auch aus höheren Pflanzen bekannt; welche Rolle sie hier spielen, darüber wissen wir allerdings im Gegensatz zu einerseits den überall vorhandenen Redox-systemen (Atmungsfermenten), andererseits den Systemen der Bakterien (Pyocyanin u. a.), noch sehr wenig. Wir kommen bei den Desmolasen auf diese reversiblen Redoxsysteme natürlich eingehend zurück; hier sei nur die Tatsache ihrer Existenz und Bedeutung erwähnt, weil es immerhin nicht ausgeschlossen ist, daß die Glykoside z. T. wirklich Reserven sind für diese in der Zellatmung wichtigen Chromogene.

So stecken vielleicht in diesen Beobachtungen über chromogene Glykoside und das Verhalten der Glykoside während verschiedener biologischer Zustände der Pflanze im Allgemeinen noch sehr wichtige Dinge, auf die man bisher nicht geachtet hat. Infolgedessen sei das allerwichtigste hier erwähnt. Es sei aus dem großen Einzelmaterial, das die Serienarbeiten der Pariser Schule über die Zusammenhänge von Glykosidverteilung und Stoffwechselperioden erbracht haben, Einiges herausgegriffen; weitere Einzelangaben finden sich zerstreut in den §§ 341, 342 citirten Arbeiten, sowie bei BRAECKE **172a**); (dort auch ältere Arbeiten).

Über die Vorgänge der Bildung von dunklen Pigmenten bei der Trocknung der Pflanzen siehe BRIDEL **173**) (bei *Lathraea clandestina*, Aucubin); ferner § 341 bei Orobosid etc.

Hier sei nur noch ohne Kommentar eine Aufzählung der bis 1930 bekannten chromogenen Glykoside nach BRAECKE **172**) wiedergegeben:

Aucubosid, Asperulosid, Meliatosid, Monotropitosid geben Aglucone, die sich bei der Oxydation polymerisiren; nur oxydirt werden die Aglucone von Arbutin und Methylarbutin.

Variationen während der verschiedenen Vegetationszeiten. Bei der einjährigen Pflanze *Rhinanthus crista-galli L.* fand BRAECKE **172a**) für Aucubin nur geringe Schwankungen (von 1,086 und 1,321 % der frischen Pflanze), am meisten während der Blüte. Da aber die Trockensubstanz dauernd zunimmt, so nimmt der Glykosidgehalt auf diese berechnet dauernd ab. Samen enthalten 3,416 %, mehr als Saccharose, so daß BRAECKE das Aucubin als Reservestoff ansieht. Ganz analog verhält sich das Aucubin bei *Melampyrum* und nach älteren Arbeiten von LEBAS (1911) bei *Aucuba japonica L.* Hier ist das Glykosid besonders angereichert in jungen Blättern und den Samen. Bei der ausdauernden Pflanze *Menyanthes trifoliata* ist dagegen das Meliatosid kein Reservestoff, da es von Mai bis Oktober abnimmt.

Bei Orchideen findet sich während der Blüte nur das Genin, kein Loroglossosid (CHARAUX **174**)); das Maximum liegt Ende März, dann allmähliche Abnahme.

Bei *Geum urbanum* nimmt das Geosid (Wurzel) zu in zwei Perioden, nämlich während der Blüte und der verminderten Assimilation; es nimmt ab, wenn die Pflanze anfängt, die Reserven zu mobilisiren (CHEYMOL **175**)); die Bewegung folgt denen der Zucker.

In den Zweigen von *Amelanchier vulgaris* hat das Gl. (Ameliarosid) ein Minimum im Mai, von Mai bis Oktober unregelmäßige Schwankungen, dann Zunahme; dann bis März ziemlich stabil, Abnahme bis Mai. — Bei den Glykosiden von *Vinca* fand VINTILESCO **177**) Maxima im Januar und Mai.

172a) ***M. Braecke***, Var. quant. des glucides au cours de la végét. annuelle. Jl. de pharm. Belg. **1932**, H. 42/3. S.A. — 173) ***M. Bridel***, Variat. de color. des plantes etc. Bull. Soc. Chim. Biol. **11**, 260 (1929). — 174) ***C. Charaux, P. Delauney***, Prés. du linogloss. etc. C. R., **180**, 1770 (1926). — 175) ***J. Cheymol***, Var. dans la comp. glucos. de la racine de Geum urb. etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 470 (1931). — 176) ***M. Bridel, J. Rabaté***, Var. dans la compos. des rameaux de Amelanchier etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **12**, 139 (1930). — 177) ***J. Vintilesco, N. J. Joanid***, Glucos. de ... genre Vinca. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 63 (1933).

In einer sehr gründlichen Arbeit kommen KLEIN u. LINSER 178) mit Aesculin als Versuchsobjekt zu dem Entscheid, daß es fortlaufend in der Pflanze gebildet wird, sich vermehrt, dann aber wieder verbraucht wird, daß es also ein echter Reservestoff ist; zur entgegengesetzten Ansicht kommt KERSTEN **170a**).

Für die cyanogenen Gl. von *Prunus laurocerasus* fanden GODWIN u. BISHOP **179**), daß die Blätter beim Hunger die Gl. vollständig verlieren, und zwar schon vor dem Gelbwerden. Der Schwund ist anfangs schnell, dann langsamer. Am stärksten beim Beginn der Vergilbung, gleichzeitig mit starker Atmung. Jüngere Blätter verlieren die Gl. langsamer als ältere.

Entstehung und Rolle der Blausäure (Sammelreferat 180)). Auch dieses Problem ist noch nicht geklärt; es ist indessen die TREUBsche Hypothese, daß HCN als primäres Assimilationsprodukt aus dem NH_3, resp. indirekt der Salpetersäure des Bodens entstehen soll, stark in den Hintergrund getreten. Es ist dies mehr allgemeinen Wandlungen der Stoffwechselphysiologie, also der Annahmen über den Aufbau der Aminosäuren zuzuschreiben als einer direkten Widerlegung der Versuche und Ideen TREUB's an sich.

Wir können darauf natürlich nicht eingehen: es sei nur soviel gesagt, daß eigentlich in allen modernen Überlegungen, wie sich Aminosäuren aus dem aufgenommenen Stickstoff bilden, garkein Platz mehr für eine — auch chemisch nicht wahrscheinliche — primäre Bildung von HCN bleibt. Trotz verschiedenartigster Möglichkeiten ist es doch am wahrscheinlichsten, daß aus den Nitraten über Nitrite ganz vorwiegend NH_3 — vielleicht neben NH_2OH — entsteht (MEWIUS **181**)), als solches von der Pflanze aufgenommen und an die Kohlenstoffketten als solches angelagert wird, vielleicht zuerst in Form von Säureamiden (BJÖRKSTEN 182)), vielleicht an ungesättigte Kohlenstoffbindungen (Asparaginsäure aus Fumarsäure, VIRTANEN **(183)**, ebenso Glutaminsäure aus Citronensäure). Jedenfalls rechnet man damit, daß sich die Aminogruppe direkt substituirt, und für die seltsame primäre Bildung von HCN bleibt kein Raum.

Tatsächlich lehnen heute wohl alle modernen Untersucher, wie ROSENTHALER (*l. c. 658*) **184**), BJÖRKSTEN **182**), STEKELENBURG **185**) die TREUBsche Hypothese völlig ab. ROSENTHALER hat einige der Versuche TREUB's betr. den Zusammenhang von KH-Stoffwechsel, d. h. Assimilation im Licht, und der Bildung von HCN nicht bestätigen können. Ebenso wenig konnte STEKELENBURG an den von TREUB selbst benutzten Blausäurepflanzen (*Phaseolus lunatus, Pangium edule*) sowie an *Prunus laurocerasus* die Ergebnisse bestätigen. Er fand entgegen TREUB HCN auch bei Abwesenheit von Nitrat, sowie reichliche Vermehrung bei Düngung mit organischen Substanzen.

Nach allgemeiner Auffassung ist HCN ein Zwischenprodukt oder wohl noch eher ein Nebenprodukt des Stickstoffwechsels, besonders bei reichlichem Angebot von Aminosäuren; aber weder ein primäres Aufbauprodukt noch ein „Exkret". Wie sie im Stoffwechsel entsteht, ist noch nicht aufgeklärt; aber jedenfalls ist sicher, daß wenn

---

178) ***G. Klein, H. Linser,*** Verteil. u. Wandel des Aesculins etc. Planta, **15,** 767; **17,** 641 (1931/2). — 179) ***H. Godwin, L. R. Bishop,*** Cyanogen. gluc. of cherry laurel etc. New Phytol., **26,** 295 (1927); BPh **45,** 481. — 180) ***M. E. Robinson,*** Cyanogen. in plants. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc., **5,** 126 (1930); BPh **57,** 569. — 181) ***W. Mewius, J. Dikussar,*** Nitrite als N-Quellen f. höh. Pflanzen. Jahrb. wiss. Bot., **73,** 633 (1930). — 182) ***J. Björksten,*** Synthese von Eiweißstoffen etc. Bioch. Zs., **225,** 1, 441 (1930). — 183) ***A. I. Virtanen,*** Enz. Spalt. der Asparaginsäure. Bioch. Zs., **250,** 192 (1932). — 184) ***L. Rosenthaler,*** Prüf. der Treubschen Hypoth. Bioch. Zs., **190,** 168 (1927). — 185) ***N. J. Stekelenburg,*** Phys. Bed. der Blaus.-Glyk. Rec. trav. bot. Néerl., **28,** 297 (1931); BPh **67,** 63; sowie Proc. Roy. Akad. Amsterdam, **34,** 1179 (1931).

sie im Überschuß entsteht, sie durch Überführung in die Glykosidform entgiftet wird. Abgesehen von ihrem also wahrscheinlich für den Stoffwechsel unwesentlichen Gehalt an HCN haben dann diese Glykoside dieselbe physiologische Dignität wie die anderen auch; sie sind also wahrscheinlich Zuckerspeicher. STEKELENBURG nimmt für die cyanogenen Glykoside daneben noch die Funktion als Stickstoffspeicher in Anspruch. Dies ist durchaus möglich, aber kaum zu beweisen. ST. fand selbst bei verschiedenen Objekten recht verschiedene Ergebnisse.

III. β-Heteroglucosidasen in Kryptogamen und Tieren.

§ 348. Wie mehrfach betont, vermeiden wir es, bei diesen Vorkommnissen von „Emulsin" der Schimmelpilze oder der Wirbellosen zu sprechen. Emulsin ist der adäquate Ausdruck für bestimmte Mischungen von verschiedenen Enzymen, wie sie eben grade in den Auszügen aus Rosaceen-samen zu finden sind. Allenfalls darf man den Begriff auf andere Präparate aus Phanerogamen übertragen, obgleich auch hier schon erhebliche Abweichungen im Typus zu verzeichnen sind, so z. B. beim Emulsin der Luzerne u. a. Aber weiter darf man nicht gehen, will man nicht die an sich erheblichen Schwierigkeiten noch künstlich vergrößern. Wir sprechen also nur von dem Vorkommen einer β-Heteroglucosidase in anderen Lebewesen als höheren Pflanzen. Als Hauptobjekt kommen die **Kryptogamen** in Betracht. Hier geraten wir nun natürlich wieder in dasselbe Irrsal von Zweifeln, wie sie die Frage des Vorkommens einer besonderen Heteroglucosidase überall begleiten. Denn wir stehen damit wieder vor der vorläufig nicht sicher zu beantwortenden Grundfrage, ob es überhaupt eine solche besondere Heteroglucosidase gibt oder eben nur eine einheitliche β-Glucosidase in etwas verschiedenem Gewande. Daß sehr viele niedere Pilze die auf Holoside wirksamen β-Glucosidasen führen, Cellobiase und Gentiobiase, mögen diese nun dasselbe oder zwei verschiedene Enzyme sein, ist längst bekannt; wenn wir dieselben Organismen nun aber auf die Spaltung von Heterosiden wie Salicin oder Amygdalin prüfen, so bleiben Überraschungen nicht aus.

Vollkommen unklar sind bisher die Verhältnisse bei den **echten Hefen**. Hier findet sich die Wirkung, die man früher als „Emulsinwirkung" beschrieben hat, und zwar in doppelter und bisher nicht zu deutender Weise. Viele Hefen enthalten die „Amygdalase", eine β-Glucosidase, die aus der noch in Agluconbindung vorliegenden Gentiobiose des Amygdalins eine Glucose abspaltet, während die Spaltung freier Gentiobiose den Hefen garnicht oder nur ausnahmsweise zukommt. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist, wie wir § 334 ausgeführt haben, diese Amygdalase doch nur eine etwas abweichende Gentiobiase. Daneben aber kommt einigen Hefen auch die volle „Emulsinwirkung" zu, d. h. sie zerlegen Amygdalin völlig auch an der Agluconbindung, indem erst Prunasin entsteht und dann weiter gespalten wird. Diese Beobachtung von HENRY u. AULD (*l. c. 672*) ist öfters bestätigt worden, exakt z. B. von WILLSTÄTTER c.s. 186). Diese Stämme von Hefen enthielten danach in unserem Sinne die β-Heteroglucosidase. Demgegenüber steht nun die Angabe (§ 335), daß allen echten Hefen Cellobiase überhaupt fehlt. Danach wäre der Sachverhalt der folgende: gewisse Hefen sollen weder Cellobiose noch freie Gentiobiose spalten, wohl aber die Heterosidbindung im Amygdalin. Das wäre also eine klare Entscheidung zu gunsten einer selbständigen Heteroglucosidase, wenn man diesen Argumenten schlüssige Beweiskraft zumessen könnte; — aber das kann man

186) ***R. Willstätter, R. Kuhn, H. Sobotka,*** Relat. Spez. der Hefenmaltase. Zs. phys. Chem., **184**, 223 (227) (1927).

eben nicht. Man kann ebenso wenig mit WEIDENHAGEN über alle diese einer Identität entgegenstehenden Befunde einfach hinweggehen wie sie als genügend für den Beweis einer Verschiedenheit erachten. Die Frage bleibt offen. Einer völligen Neuaufnahme sollten eigentlich mit moderner Methodik keine besonderen Schwierigkeiten entgegenstehen. Es sollte doch festzustellen sein, ob freigelegte Hefenenzyme (nicht ganze Zellen, diese Beobachtungen besagen sehr wenig) tatsächlich einfache Heteroside wie Salicin etc. spalten, ohne Cellobiose oder Gentiobiose anzugreifen. An einer solchen Bearbeitung der Frage in neuerer Zeit fehlt es völlig, es liegen seit den im H. W. S. 615/6 mitgeteilten Befunden kaum weitere vor, soweit es sich um die Spaltung von Heterosiden handelt, und so bleibt die ganze Frage offen. Nur für Milchzuckerhefen liegen, wie bereits § 335 mitgeteilt, einige moderne Befunde vor. NEUBERG u. HOFMANN **187)** haben an isolirten Enzymen gefunden, daß sie sowohl Cellobiase wie Salicin spalten. Dagegen greift eine mit Milchzucker vorbehandelte lactasehaltige Bierhefe zwar Amygdalin an, nur durch Amygdalasewirkung, aber nicht Salicin (HOFMANN **188)**).

Ebensowenig, wenn auch aus ganz anderen Gründen, sind diese Fragen bisher bei den **Schimmelpilzen** zu klären. Hier liegt die Sache so, daß die gebräuchlichen Objekte der Untersuchung eben alle β-Glucosidasen enthalten, und man mangels einer genügenden präparativen Trennung eben nicht sagen kann, wieviele verschiedene Enzyme sie enthalten. Die Schimmelpilze enthalten, nach der Wirkung gemessen, eben sowohl „Cellobiase" wie „Gentiobiase" und Heterosidasen. Neues Material seit dem H. W. S. 615 liegt kaum vor. Ein Hauptobjekt der Forschung ist auch hier die Taka von *Aspergillus oryzae*, dessen kräftige Wirkung auf verschiedene β-Glucoside (Amygdalin, Salicin, Aesculin, β-Methyl-glucosid) zuerst von HATANO **189)** angegeben worden ist; seither ist der Pilz viel verwendet worden; eine Mitteilung von MATSUMOTO **190)** bringt diesbezgl. nichts Neues.

Ebenso sind aber auch andere Schimmelpilze häufig vergleichend auf verschiedene Substrate geprüft worden, um den Spezifitätsfragen näher zu kommen, ohne entscheidende Ergebnisse. Auf die diesbzgl. Untersuchungen HOFMANN's **192)** an *Asp. niger und oryzae* haben wir bereits § 332 hingewiesen. Sehr wertvoll sind auch die Beobachtungen von GRASSMANN c.s. **191)**. In diesen finden wir einen wichtigen Hinweis auf die Sondernatur der Hetero-glucosidase darin, daß die gereinigte Cellulase ihrer Präparate Salicin nicht mehr angreift; freilich waren diese Cellulase-präparate auch schon von Cellobiase ziemlich weitgehend befreit, so daß auch hier kein schlüssiger Beweis vorliegt.

Bei **Bakterien** liegen die Verhältnisse auch noch sehr unklar. Wie stets darf man aus dem Verhalten lebender Bakterien keine bindenden Schlüsse ziehen, und an isolirten Enzymen ist sehr wenig gearbeitet. HOFMANN **193)** fand bei *B. Prodigiosus* überhaupt keine Glykosidspaltung, bei *Bact. Delbrücki* und *B. coli* nur β-Galactosidase, keine β-Glucosidase. Ein Sulfatase-Bakterium enthielt beide, bei Züchtung auf Bierwürze auch α-Glucosidase. Enzym aus *Termobacterium mobile* greift nach FORSSMAN **194)** weder Salicin noch Amygdalin an.

---

187) ***C. Neuberg, E. Hofmann,*** β-Glucosidase. Bioch. Zs., **256,** 450 (1932). — 188) ***E. Hofmann,*** Lactase in untergär. Hefe. ebd. **265,** 209 (1933). — 189) ***J. Hatano,*** Amygdalinspalt. durch Takadiast. Bioch. Zs., **151,** 498, 501 (1924). — 190) ***A. Matsumoto,*** Vork. von α- und β-Glucosidase in Takadiast. Act. Scholae Med. Kioto, **10,** 285 (1928); BPh **47,** 816. — 191) ***W. Grassmann c.s.,*** Spec. cellulosespalt. Enz. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **502,** 20 (1933). S.A. — 192) ***E. Hofmann,*** Glucoside spalt. Enz. in Schimmelp. Bioch. Zs., **273,** 198 (1934). S.A. — 193) ***Ders.,*** Glykosidasen in Bakt. Bioch. Zs., **272,** 133 (1934). S.A. — 194) ***S. Forssman,*** Enzymsystem des Termobact. mobile. Bioch. Zs., **264,** 231 (1933).

Weitere Arbeiten sind rein kasuistisch zu werten; so Angaben von Spanier **194a**), daß Enterokokken (hämolytische und nicht hämolytische) regelmäßig Glucoside angreifen, Streptokokken nur unregelmäßig, am ehesten noch Salicin, seltener Amygdalin, Arbutin, Aesculin. — *Bac. mycoides* spaltet Arbutin, das Enzym konnte nicht isolirt werden (**195**). Nach Orla-Jensen **195a**) wird Aesculin von allen Streptococcen zerlegt (Ausnahmen *Str. mastitidis* und *thermophilus*). Andere Bakterien, so *B. bovis* bewirken Dunkelfärbung. — Weitere rein casuistische Angaben werden sich in vielen Arbeiten über Bakterien und ihren Enzymapparat finden; es ist unmöglich und auch ohne Belang, sie sämtlich aufzusuchen und zu citiren. Im „Allg. Teil" werden wir bei „Bakterienfermenten" weiteres Material bringen.

§ 349. β-Heteroglucosidase bei Tieren. Bei Wirbeltieren läßt sich nunmehr wohl mit Sicherheit sagen, daß β-Glucosidasen jeglicher Art fehlen; die bisweilen aufgefundenen kleinen Wirkungen dürften doch wohl auf Bakterien zu beziehen sein, wenn nicht vielleicht doch die Leukocyten etwas β-Glucosidase führen.

Auf Bakterien dürfte wohl auch der einzige mir bekannt gewordene positive Befund einer Amygdalinspaltung (HCN-Bildung) im Sperma zu beziehen sein (**196**). — Pighini **197**) fand wieder kein Emulsin im Liquor cerebrospinalis.

Dagegen sind β-Glucosidasen bei Wirbellosen weit verbreitet (H. W. S. 617;) Amygdalinspaltung in Miesmuscheln (*Mytilus californicus*) fand neuerdings Fox **198**). Daß *Helix* ein abweichendes Enzym enthält (Giaja, *l. c. 705*), scheint sich zu bestätigen, aber in anderer Weise; denn es gibt Glucoside, die angeblich gegen Emulsin resistent sind, aber von *Helix* gespalten werden, so z. B. Steviosid, Melilotosid, das Oleandrin von Tanret u. a. (§§ 341, 342).

IV. Darstellung und Eigenschaften.

1) Darstellung.

§ 350. Über die β-Heteroglucosidase als solche ist immer noch sehr wenig bekannt. Eine wirkliche Trennung der vielen Einzelenzyme im klassischen Emulsin oder gar in den Schimmelpilzen ist noch nicht erreicht, wie ja bereits aus den noch offen stehenden Fragen besonderer specifischer Enzyme immer wieder hervorgeht. Am wichtigsten ist es, daß bisher eine präparative Trennung der Glucosidase von der Lactase nicht gelungen ist, so daß Helferich, wie § 332 erörtert, mit der Möglichkeit ihrer Identität rechnet. Dagegen ließ sich die α-Mannosidase abtrennen (§ 330), ebenso eine Chitinase und eine Glucuronidase (Helferich).

Zur **Darstellung** (s. a. **199**)) ist prinzipiell wichtig die Angabe von Bridel **200**), daß man als Ausgangsmaterial auch die viel billigeren bitteren Mandeln verwenden kann. Man behandelt sie erst mit 70 %-igem Alkohol, wobei alle Zucker und das gesamte Amygdalin herausgelöst werden, ohne das Enzym zu schädigen. Wasserextraktion liefert dann typisches Emulsin.

194a) ***F. Spanier***, Glykosidspalt. Vermögen etc. der Enterokokken etc. Cbl. Bakt., **105**, 1 (1927). — 195) ***H. Glinka-Tschernorutzky***, Arbutasegehalt bei Bac. myc. Bioch. Zs., **226**, 62 (1930). — 195a) ***A. D. Orla-Jensen***, Applic. of aesculin for the identif. of bact. Acta Path. Skand., **11**, 312 (1934); BPh **88**, 208. — 196) ***B. Boldrini***, Nuova reaz. d. sperma etc. Arch. di Antrop. crimin., **48**, 495 (1928); BPh **48**, 263. — 197) ***G. Pighini, E. Rizzatti***, Glucosidasi etc. Bioch. Ter. Sper., **11**, 198 (1924); BPh **27**, 441. — 198) ***D. L. Fox***, Emulsin in cert. marine invertebrates. Biochem. Jl., **28**, 1674 (1934). — 199) ***K. Tauböck***, Emulsin. Hb. der Biol. Arbeitsmeth. IV, **2**, 2249 (Berlin und Wien 1935). S.A. — 200) ***M. Bridel, M. Desmarest***, Proc. perm. d'extraire . . . de l'emulsine. C. R., **185**, 1514; Bull. Soc. Chim. Biol., **10**, 373 (1927).

Reinigung des Rohenzyms. Seit den Verfahren von WILLSTÄTTER sind wesentliche Verbesserungen durch JOSEPHSON und HELFERICH durchgeführt worden. Genaue Beschreibung der Verfahren, soweit nicht in Bd. III des H. W. behandelt, bei TAUBÖCK **199)**.

JOSEPHSON **201)** gelang es zunächst, die an sich schon spärlich (1 : 200) vorhandene Amylase gänzlich abzuscheiden. Eine Verminderung ließ sich erreichen durch Alkoholfällung oder Tonerde, an die Glucosidase leichter adsorbirt wird als Amylase. Ein völliges Ausschalten der Amylase zugleich mit erheblicher Wirkungssteigerung (auf das Achtfache, Sal. f von 0,61 auf 4,8) gelang durch Kaolin bei ph = 4,4. Dabei wird von dem Gehalt des Rohenzyms etwa die Hälfte adsorbirt. Dann Elution mit NH_3 und Dialyse.

Noch wirksamere Präparate erhielten HELFERICH c.s. **202)** durch eine sehr sorgsame Ultrafiltration durch Eisessig-Kollodium-filter bei fünfmaliger Wiederholung. Unter allerdings enormen Verlusten wurde eine Wirkungssteigerung auf das 740-fache des Rohenzyms erreicht, Sal. f = 11,1. Eine gewisse Schonung des bei fortschreitender Reinigung sehr empfindlich werdenden Enzyms kann man erreichen, wenn man möglichst nahe dem Neutralpunkt arbeitet (**203**).

Schneller und mit größerer Ausbeute kann man sehr hochwertige Präparate erhalten (Glucosidasewert 9,4—12) mittels des von WINKLER ausgearbeiteten „Silberverfahrens" (**204**). Es wird zunächst durch Fällung mit Tannin ein Rohferment erhalten, das durch Aceton gereinigt wird. Dieses Rohferment wird in 1 %-iger wäss. Lösung fraktionirt mit Silberoxyd oder auch Silberacetat gefällt, Silber mit Schwefelwasserstoff entfernt. Erst fallen fast unwirksame Niederschläge, dann die Hauptmenge des Ferments, wie gesagt in sehr hochwertigem Zustande mit einem Glucosidasewert von etwa 10, besonders wenn die ganze Prozedur mehrfach wiederholt wird. Auch in diesem Präparat geht die Galactosidase noch mit, während die Amylase völlig verschwunden ist (**204a**). Beifolgende kleine Tabelle zeigt die relative Wirksamkeit gegen die verschiedenen Substrate bei den einzelnen Stadien der Reinigung (**204**).

Nr.	Substrat	Wertigkeit			Verhältnis
		1. des Rohferments	2. der Vorfällung	3. der Hauptfällung	
	Salicin *)	1,25	0,45	9,4	1 : 0,36 : 7,5
I	Phenol-β, d-galaktosid	51	18	386	1 : 0,36 : 7,6
II	Phenol-α, d-galaktosid	9.6	2,0	0,5	1 : 0,2 : 0,05
III	Phenol-α, l-arabinosid	32	10	250	1 : 0,31 : 7,8
IV	Phenol-β, l-arabinosid	7	3,5	0,6	1 : 0,5 : 0,09
V	Phenol-β, d-xylosid	2,9	1,2	24,5	1 : 0,4 : 8,4
VI	Phenol-β, d-Glucosid-6-bromhydrin	5,8	1,8	45	1 : 0,35 : 7,5

*) Beim Salicin ist die Wertigkeit als β-Glucosidasewert mit Minuten berechnet, also mit den anderen nach Tagen berechneten Wertigkeiten nicht direkt vergleichbar.

Darstellung und Reinigung von Oxynitrilese. NORDEFELDT (l. c. 159) extrahirt fettarmes Mandelpulver mit alkalischem Wasser, fällt mit Aceton, Produkt von Reinheitsgrad 100. Dialyse, Fällung mit Säure, Sorption an Tonerde, Elution Reinheitsgrad 700. Nach Fällung mit Bleiacetat 3000—10.000. Enzym frei von KH und Protein.

201) ***K. Josephson***, Enzyme des Emulsins. Ber. Chem. Ges., **58**, 2726; **59**, 821 (1925/6). — 202) ***B. Helferich, H. Bredereck***, Emulsin III. Zs. phys. Chem., **189**, 273 (1930). S.A. — 203) ***Ders., A. Schneidmüller***, Emulsin IV. ebd. **198**, 100 (1931). S.A. — 204) ***Ders., S. Winkler, R. Gootz, O. Peters, E. Günther***, Emulsin VII. ebd. **208**, 91 (1932). S.A.; s.a. ebd. **209**, 272 (1932). — 204a) ***Ders., O. Lang***, Emulsin XI. ebd. **216**, 123 (1933). S.A.

Albers c.s. (l. c. 162/3) stellen ein haltbares und auch in Lösung beständiges Präparat her durch Wasserextraktion entölter Samen, Ausfällung des Eiweißballastes bei ph = 4,8, zentrifugiren, Dialyse. Vor dem jeweiligen Versuch wird die Lösung mit der gleichen Menge absol. Alkohol versetzt und filtrirt.

Eigenschaften des Reinenzyms. Diese hochwertigen Präparate sind auch in lufttrockenem Zustande nicht sehr beständig. Rohpräparate sind recht beständig (§ 352).

Alle diese modernen Präparate zeigen noch Eiweißreaktionen im Gegensatz zu den alten Befunden Ohta's über eiweißfreies Emulsin, die allerdings auch von Nordefeldt bestätigt sind. Das Präparat von Josephson gab keine Molisch-Reaktion, wohl aber schwach Xanthoprotein. Auch die Präparate von Helferich zeigen noch Proteinreaktionen bei sehr wenig Asche (0,025 % bei Sal. f = 3,1). Ein Muster mit Sal. f = 4,5 war noch zu 70 % beim Erhitzen koagulirbar (**202**).

Auch bei direkter Wiederholung der Versuche von Ohta und Nordefeldt konnte Tauber **205**) kein eiweißfreies Emulsin erhalten. Sein Verfahren war im wesentlichen: Extraktion mit verdünntem und Fällung mit konz. Alkohol, dann Verdauung mit Trypsin nach Ohta oder Fällung mit Bleiacetat nach Nordefeldt.

2) Quantitative Bestimmung.

§ 351. Emulsin wird entweder bestimmt durch Analyse der entstehenden Glucose, oder bei Amygdalin als Substrat durch Bestimmung des HCN.

Zur Methodik der Zuckerbestimmung ist an dieser Stelle nichts Prinzipielles zu sagen. Methodische Einzelheiten in den Arbeiten Helferich's; z. B. soll man nach (**202**) bei ph = 4,5 arbeiten und bei einer Temp. von 30°, wenn man polarimetrisch mißt.

Ältere Methodik zur **Bestimmung der Blausäure** s. bei Rosenthaler im H. W. Bd. III, S. 869. Ebenso bei Tauböck (l. c. 199), der auch die mikrochemischen und histochemischen Methoden des Nachweises von HCN schildert. Einige neuere Verfahren seien hier ganz kurz erwähnt. Roe **206**) destillirt im Luftstrom ab in eine Lösung von NaOH und titrirt mit $AgNO_3$ zurück; genaue Anweisungen für dies Verfahren bei Hagen **207**) und Bishop **208**). Kolorimetrische Methoden wie die nach Holböll und Kolthoff sind für diese Zwecke unbrauchbar. Verbesserung und genaue Schilderung der Brunswik'schen Methode, mikrochemische Darstellung von Kristallen von AgCN unter Verwendung angesäuerter Lösung von $AgNO_3$ bei Malitzky **209**).

Einheiten: Über die Willstätter-schen Einheiten („Zeitwert", „Glucosidasewert" etc.) s. H. W. S. 180 und bei Josephson **210**). Glucosidasewert unter den „Normalbedingungen" zum Vergleich mit anderen Fermenten s. Weidenhagen § 307. Josephson verwendet auch hier die allgemeine Bezeichnungsweise v. Euler's auf Grundlage der Konstante der monomolekularen Reakt. Geschw. k. Es ist

$$\text{Sal. f} = \frac{\text{k g Substrat}}{\text{g Enzympräp.}},$$

und wenn man so arbeitet, daß g Substrat = 1 ist, wird

$$\text{Sal. f} = \frac{\text{k}}{\text{g Enzympräp.}}$$

---

205) ***H. Tauber,*** Chem. Nature of emulsin etc. Jl. of Biol. Chem., **99**, 257 (1932). — 206) ***J. H. Roe,*** Estim. of HCN etc. Jl. of Biol. Chem., **58**, 667 (1924). — 207) ***S. K. Hagen,*** Best. von HCN in Limabohnen etc. Zs. Unt. Lebensm., **55**, 284 (1928). — 208) ***L. R. Bishop,*** Estim. of cyanogen. glucos. Biochem. Jl., **21**, 1162 (1927). — 209) ***W. P. Malitzky c.s.,*** Mikrochem. Best. von HCN etc. Mikroch., **7**, 94 (1929). — 210) ***K. Josephson,*** Enzym. Spalt. von Glykosiden. Zs. phys. Chem., **147**, 1 (1925).

Dies wird dadurch erreicht, daß man eine 2 %-ige Salicinlösung verwendet (= 0,07 n.) und davon je 50 ccm. Bedingungen 30° und ph = 4,4. Aus der zu ca. 38 bestimmten Affinitätskonstante der Salicin-Glucosidase-verbindung ergibt sich ein Umrechnungsfaktor für beide Werte. Man muß den Glucosidasewert mit 0,0605 multipliziren:

GlW. × 0,0605 = Sal. f. (z. B. 1,5 GlW. = Sal. f 0,09).

Die Einheiten der Oxynitrilese nach ALBERS c.s. (l. c. 163) sind bereits § 345 mitgeteilt

3) Verhalten gegen äußere Einflüsse.

§ 352. Beständigkeit. Rohpräparate sind sehr beständig. BRIDEL **212)** fand in einem 8 Jahre alten Trockenpräparat die Saccharase fast verschwunden, die β-Glucosidase unverändert, auch nach 23 Jahren war sie noch vorhanden.

Bei Syntheseversuchen mit Methanol wird das immer wieder benutzte Ferment allmählich schwächer (**213**). Aber auch in wäss. Lösung ist nach 13 Wochen die Wirkung zwar deutlich abgeschwächt, aber nicht erloschen; je verdünnter die Lösung, um so schneller die Abschwächung (**214**). Auch TAUBÖCK (l. c. 199) fand ein Trockenpräparat nach 10 Jahren noch unverändert wirksam.

Auch die Oxynitrilese ist nach NORDEFELDT (l. c. 159) und ALBERS (l. c. 162/3) sehr stabil, nach ALBERS aber in wäss. Lösung nur in der Kälte, bei 45° geht sie in 14 Tagen auf 60 % der Wirkung zurück.

Die Reinpräparate sind empfindlicher. TAUBÖCK gibt bei einem Trockenpräparat Rückgang binnen 6 Monaten von Zeitwert 11 auf 18 an. HELFERICH **203)** findet die Beständigkeit in Lösung abhängig vom ph; am größten ist sie beim Neutralpunkt, dann nach beiden Seiten erst langsam, dann schneller abfallend (Abb. 26).

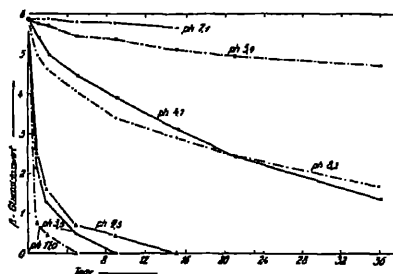



Abb. 26. Inaktivirung des Emulsins bei verschiedenem ph nach HELFERICH c.s. 203).

Temperatur. Wesentlich Neues gegenüber den Angaben im H. W. liegt nicht vor. Kochen mit Alkohol schädigt auch Trockenpräparate, in 10 Min. Zeitwert von 56 auf 88,7 (HELFERICH). OLIVE **211)** untersuchte die Zerstörung in Allyl-alkohol verschiedener Konzz. Bei 40 % Zerstörung bei ca. 55°; bei 90 % schon unter 30° Aktiv.-Verminderung, Zerstörung aber erst bei 65°.

Tötungstemp. der Oxynitrilese 75° (NORDEFELDT, l. c. 159).

UV-Strahlen wirken auf Reinenzyme viel stärker als auf Rohenzyme. Nach HELFERICH **211a)** wirken nur die Strahlen bei 254 mμ schädlich; anscheinend liegt eine spezifische Absorption dieser Wellenlänge durch das Enzym selbst vor.

Optimaler ph. WILLSTÄTTER fand ihn schwankend je nach der Art des Substrates (außer Amygdalin) zwischen 4,4 und 5,3 (H. W. S. 620). JOSEPHSON **210)** fand dagegen für Salicin und Helicin nahezu identische Kurven, für Methyl-glucosid und Arbutin etwas mehr nach dem Sauren. Ph von 2,0 vernichtet sofort (TAUBER **205)**). Opt. ph der Oxynitrilese 5,2—5,4 (l. c. 159).

---

211) ***M. Olive,*** Tempér. de déstruct. de l'emulsine etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **13,** 272 (1931): — 211a) ***B. Helferich, G. Brieger,*** Schäd. von Emulsin durch UV-Strahlen. Zs. phys. Chem., **221,** 94 (1933). S.A. — 212) ***M. Bridel, M. Desmarest,*** Conserv. . . . de l'emulsine etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **10,** 1050, 1056 (1928). — 213) ***M. Bridel, N. Joanid,*** Dimin. de l'activ. de la glucosidase β etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **12,** 981 (1930). — 214) ***C. Bourdouil, Hsieh-Yü,*** Influ. d'une macér. aqu. . . . sur l'emulsine etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **14,** 645 (1932).

Die cyanogenen Spaltungen scheinen durchweg einen etwas höheren opt. ph zu haben. WILLSTÄTTER hatte für Amygdalinspaltung 6,0 angegeben; HAGEN 207) findet denselben für Linamarase.

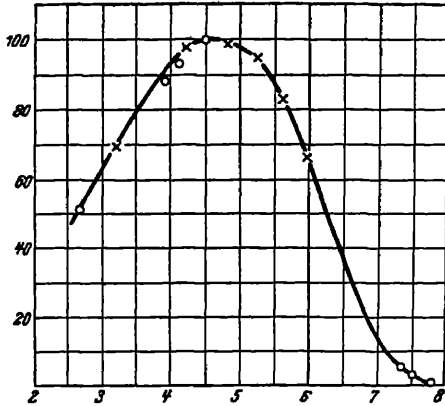



Abb. 27. Aktivitäts-pH-Kurve für die Salicinspaltung nach JOSEPHSON.

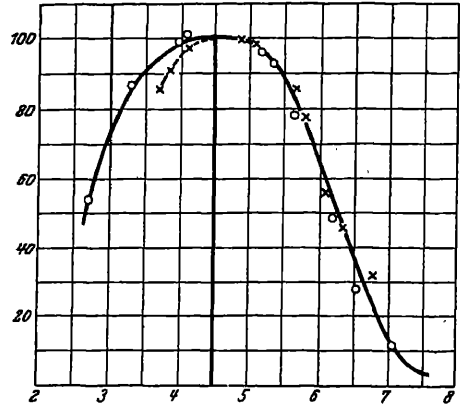



Abb. 28. Aktivitäts-pH-Kurve der Helicinspaltung nach JOSEPHSON.

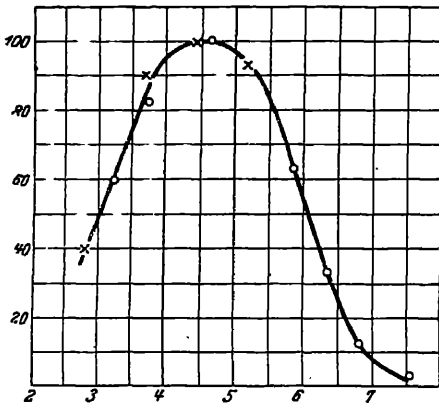



Abb. 29. Aktivitäts-pH-Kurve der β-Methylglucosidspaltung nach JOSEPHSON.

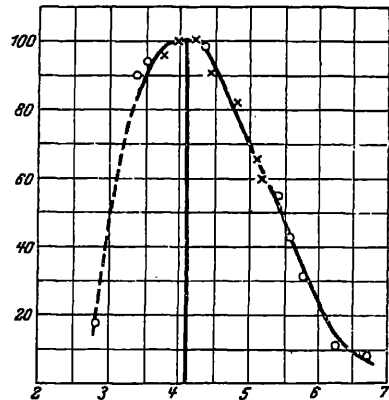



Abb. 30. Aktivitäts-pH-Kurve der Arbutinspaltung nach JOSEPHSON.

Salze: KEESER 215) hatte angegeben, daß Ca und Mg infolge Beeinflußung des kolloiden Zustandes des Enzyms bei Salicinspaltung fördernd wirken; bei sehr geringer Konz. Mg > Ca (0,000476 m), bei 0,0476 m Ca > Mg. Indessen scheint sich diese Kationenwirkung nur auf Begleitstoffe zu beziehen, denn bei Reinfermenten fand HELFERICH 215a) überhaupt keine Wirkung der Kationen. Dagegen findet sich eine sehr erhebliche Steigerung durch Anionen, bis auf 300 %, und zwar etwa parallel mit der lyotropen Reihe:

---

215) ***E. Keeser,*** Einfluß von Mg- und Ca-Chlorid auf ein: Ferm. Arch. für exp. Path., **160,** 668 (1931). S.A. — 215a) ***B. Helferich, E. Schmitz-Hillebrecht,*** Emulsin XX. Zs. phys. Chem., **234,** 54 (1935). S.A.

Zusatz: (K-Salze)	CNO′	SO_4''	Br′	$Fe(CN)_6''''$	ClO_3'	J′	NO_3'	ClO_4'	SCN′
Steigerung	1,0	1,1	1,2	1,3	(1,5)	1,8	2,1	(2,3)	(2,6)

Zusatz: (NH_4-Salze) .	F	Cl	Br	ClO_3	J	NO_3	ClO_4	SCN
Steigerung...........	0,9	1,3	1,3	1,9	2,0	2,0	3,0	2,5

Die Kinetik wird nicht geändert, auch bei Salzzusatz monomolek. Reaktion. Mit steigender Konz. nimmt die Aktivirung zu bis zu einem Grenzwert, der bestehen bleiben oder auch wieder absinken kann:

$NaClO_3$-Konzentr. im Bestimmungsgemisch	0,00083	0,0083	0,017	0,033	0,05	0,067	0,083	0,83
Steigerung	1	1,1	1,2	1,4	1,7	1,7	2,1	2,1
NH_4SCN-Konzentr. im Bestimmungsgemisch	0,0083	0,043	0,05	0,07	0,083	0,17	0,42	0,83
Steigerung	1,8	2,0	2,4	2,4	2,3	2,2	1,5	0,14

Die Salzaktivirung ist am stärksten beim opt. ph. Salze fördern auch durch Ozon geschwächtes Ferment (s. u.). Die Aktivirung ist erheblich verschieden nach den Substraten. Bei an sich schnell spaltbaren Glucosiden (o-Kresol, Kaffeesäure u. a.) ist die Förderung klein; aber sie ist es auch bei dem langsam gespaltenen Methylglucosid. Es kann sich also nicht bloß um eine Dispersitätserhöhung, eine Peptisirung des Fermentes an sich handeln, sondern es müssen noch spezifische Einflüsse dabei sein, die aber noch nicht zu deuten sind.

Schweres Wasser vermindert die Spaltung von Salicin um 25 %, von Enzymwert 1,33 auf 1,055 **(216a)**.

Ozon (216) wirkt in geringer Menge sofort vernichtend. Beim Rohferment auf 1 E.-E. 0,0115 g Ozon, bei Reinenzym 0,0034 g; fast konstant für alle Präparate. Ein Teil der Ozonwirkung richtet sich also beim Rohferment auf belanglose Begleitstoffe. Parallel mit der Enzymschädigung geht eine Zerstörung des Tryptophans, aber ohne sicheren ursächlichen Zusammenhang. Allerdings wirkt von allen Aminosäuren nur Tryptophan voll schützend; Tyrosin und Cystin schützen garnicht, Histidin, Phenylalanin wenig. Die Schädigung richtet sich gleichmäßig auf Galactosidase und Glucosidase, auf Mannosidase stärker. β-Galactosidase (aus Luzerne) und Malzamylase sind sehr empfindlich; α-Glucosidase (Hefe) nur wenig. — Beim Ozonisiren fällt ein Niederschlag aus, der fast die Hälfte des Enzyms enthält, aber wohl nicht ein Derivat des Ferments selbst ist.

Aethylen hat keinen Einfluß (Englis **217**)). Formaldehyd schädigt stark, anfangs sehr rasch, dann langsamer, teilweise reversibel; Galactosidase wird weniger geschädigt als Glucosidase **(217a)**. Jodessigsäure hemmt bei Emulsin erst bei m/10, dagegen hört schon bei m/5000 die Spaltung von Salicin etc. durch *Streptococcus lactis* auf (Meyer **218**)).

Über die Hemmung durch verschiedene Zucker s. Josephson **215**). Es hemmen am stärksten die β-Zucker (Glucose, Xylose, etc.), Fructose garnicht.

Pyridin und Dioxan hemmen erst bei hohen Konzz. (Tauböck l. c. 199). Pepsin und Trypsin sind ohne Einfluß (Tauber **205**)).

V. Sonstige Heteroside und ihre Spaltung.

§ 361. In diesem Kapitel wollen wir nunmehr in Abänderung der Disposition des Hauptwerkes alle Heteroside unterbringen, in denen nicht β-Glucose an der Agluconbindung steht. Wir haben uns also insofern die Sache erleichtert, als wir rein dispositionell davon ausgegangen sind, daß alle Spaltungen, bei denen Glucose vom Aglucon losgelöst wird, einer einheitlichen Enzymgruppe zuzumessen sind, die wir systematisi-

216) ***B. Helferich c.s.***, Einwirk. von Ozon auf Mandelemulsin. Zs. phys. Chem., **229**, 112 (1934); **233**, 75 (1935). S.A. — 216a) ***E. W. R. Steacie***, Enzym. Spalt. von Salicin... in schwerem Wasser. Zs. physikal. Ch. **B**, **28**, 236 (1935). — 217) ***D. T. Englis, F. A. Dykins***, Eff. of ethylene upon ... emulsin. Jl. Amer. Chem. Soc., **53**, 723 (1931). — 217a) ***B. Helferich, S. Winkler***, Einfl. von Formalin auf ... Emulsin. Zs. phys. Chem., **221**, 98 (1933). S.A. — 218) ***K. Meyer***, Einfl. der Monojodessigs. auf die ... Glykosidspalt. Bioch. Zs., **262**, 329 (1933).

rend eben deswegen als β-Heteroglucosidasen bezeichnet haben. Alle die Zweifel, die sich an diese Einteilung noch knüpfen, haben wir innerhalb dieser Besprechungen diskutirt, so insbesondere die Frage, ob die Heteroglucosidase gegenüber der Hologlucosidase ein eigenes Enzym ist. Weiterhin haben wir die früher getrennten Typen dieser Heteroglucosidasen einfach kassirt, so die besonderen Enzyme, welche die Heteroside der Vicianose und der Primverose zerlegen etc. Als völlig neues Problem sind nun freilich die Fälle aufgetreten. in denen angebliche Spezialenzyme eine Glucose aus komplexen Glykosiden herausspalten, während die isolirten Biosen angeblich überhaupt enzymfest sind. Diese Fälle sind bisher nicht zu ordnen, wir haben sie vorläufig sozusagen als Anhang zu den Heteroglucosidasen im § 342a untergebracht.

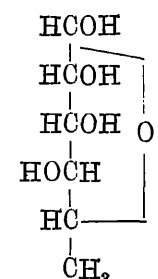
Wir haben also eine gewisse Einheitlichkeit dadurch erreicht, daß wir auf diese Weise alle Heteroside mit Glucose am Aglucon zusammengefaßt haben. Demgegenüber stehen also alle Heteroside, bei denen eine andere Gruppe am Aglucon gebunden ist. Zur weiteren Unterteilung dieses Gebietes können wir drei Gruppen sondern. Es können die bindenden Gruppen am Aglucon andere Zucker sein, oder Uronsäuren oder endlich Thioglucose. Sonstige Glykoside sind bisher nicht bekannt.

1) Heteroside anderer Zucker.

In dieses Gebiet ist noch keine gesicherte Ordnung hineinzubringen. Wir stoßen hier sogar auf die Grenzfrage unserer Darstellung überhaupt, indem nämlich für eine Reihe natürlicher Heteroside volle Resistenz gegen alle Enzyme angegeben wird. Ferner erhebt sich die zweite Frage, ob für überhaupt erfolgende Spaltungen regelmäßig oder überwiegend eigene Spezialenzyme nötig sind, die nur in den betr. Pflanzen selbst vorkommen, ob wir also grundsätzlich die hier tätigen Enzyme von der Hetero-glucosidase trennen müssen.

Nur ein Gebiet dieser Untergruppe ist einigermaßen gesichert: die Spaltung der Riboside der Purinbasen durch Fermente, die sehr wahrscheinlich wirklich spezifisch sind. Es sind dies die Nucleosidasen, die wir aus rein äußerlichen Gründen wegen ihres engen Zusammenhanges mit den anderen Fragen der enzymatischen Aufspaltung der Nucleinsäuren in einem diese Fragen zusammenfassenden Kapitel Nucleasen behandeln wollen. Auf diese kommen wir also hier nicht mehr zurück.

Dagegen spielen andere Pentosen hier die Hauptrolle, und zwar durchweg nicht einfache Pentosen, sondern abweichend gebaute Methylpentosen, vor allem l-Rhamnose. Hier ist nun eine grundsätzliche Wandlung insofern eingetreten, als die frühere Ansicht, daß alle Pentoside außer den Nucleosiden unspaltbar sind, aufgegeben worden ist. Die Pentoside sind spaltbar, wenn sie dieselbe Konfiguration haben wie d-Glucose resp. wie d-Galactose, durch die auf diese Zucker eingestellten Enzyme. Es sind also auch Xyloside und Arabinoside spaltbar (§§ 332, 343). Wir stehen also nicht vor einer generellen Fermentfestigkeit der Pentoside, wenn wir diese neuen Fragen prüfen wollen. Hier handelt es sich freilich um ganz andere Zucker, in erster Linie um l-Rhamnose, ferner um Digitoxose, Cymarose u. Ae. Diese Zucker unterscheiden sich so tiefgreifend von den nahe verwandten bisher besprochenen, daß hier wohl andere Verhältnisse vorliegen können. So ist die natürliche Rhamnose trotz ihrer Rechtsdrehung wie es scheint der Linksreihe angehörig und hat jedenfalls eine ganz andere Konfiguration wie die d-Glucose; bei den anderen Zuckern steht die Konfiguration noch nicht fest. Der d-Glucose entspricht, wie mehrfach betont, die d-Isorhamnose, deren Heteroside spaltbar sind; die l-Rhamnose hat demgegenüber nebenstehende Konfiguration. Wenn

nun immer wieder angegeben wird, daß die natürlichen Rhamnoside gänzlich unspaltbar sind, ebenso auch die synthetischen, die wir § 343 kurz mit erwähnt haben, so ist es möglich, daß wir hier wirklich an die Grenzen der absoluten Spezifität der Oligasen überhaupt kommen. Aber sichergestellt scheint mir dies nicht. Eine volle Unspaltbarkeit auch durch eigne Zellfermente würde zu unseren bisherigen Annahmen über die biologische Rolle der Glykoside als Reservestoffe durchaus nicht passen. Und abgesehen davon haben wir es nun schon oft genug erlebt, daß aus einer Nicht-spaltbarkeit erst eine Schwerspaltbarkeit und schließlich eine normale Spaltbarkeit wurde; es ist ebenso gut möglich, daß man die eventuell vorhandenen zellspezifischen Fermente noch nicht hat nachweisen können. Wir müssen hier die weitere Entwicklung der experimentellen Forschung abwarten; vielleicht kommen die „Rhamnosidasen" etc. doch noch zum Vorschein und beantworten diese interessanten Fragen.

```
 HCOH
  |  ———
 HCOH  |
  |    |
 HCOH  O
  |    |
HOCH   |
  |    |
 HC————
  |
 CH3
l-Rhamnose.
```

Ob es außer Rhamnose und den Zuckern um die Digitoxose herum noch andere Zucker an der Aglucon-bindung gibt, ist bisher nicht sicher.

Vielleicht ist dies der Fall bei einer kleinen Gruppe von natürlichen Heterosiden, bei denen am Aglucon zwei isomere Trisaccharide (Rhamninose und Robinose) sitzen, die aus 2 l-Rhamnose + 1 Galactose bestehen; ihre nähere Struktur ist nicht erforscht. Die Aglucone sind Flavonole. Die Zucker selbst und ihre bisher völlig unklare enzymatische Zerlegung sind § 332 erwähnt worden, weil sie vielleicht durch β-Galactosidase gespalten werden. Die Aglucon-bindung wird u. A. durch die Präparate zerlegt, die man als „Rhamnodiastase" bezeichnet (§ 337), also jedenfalls auch durch „Emulsin". Ob es auch hier die β-Galactosidase ist, oder vielleicht ein spezifisches Enzym, können wir nicht aussagen, da wir bisher noch nicht einmal wissen, ob vom Trisaccharid die Rhamnose oder die Galactose am Aglucon sitzt. So bleibt uns nur eine einfache Beschreibung übrig.

Bisher sind 2 dieser Glykoside näher untersucht: **Xanthorhamnin** (H. W. S. 635) findet sich in den Samen von *Rhamnus infectoria* (Gelbbeeren, Avignonkörner). Ein Enzym der Samen spaltet in Rhamninose + Rhamnetin, ein Methyl-quercetin, also ein Methyl-tetraoxy-flavonol.

Robinin (Robinosid) findet sich in *Robinia pseudacacia* und anderen Leguminosen, so *Melilotus*. Enzymspaltung durch „Rhamnodiastase" führt nach CHARAUX **219)** zu Robinose + Kaempferol (1, 3, 4'-Trioxy-flavonol). Das Glykosid kommt auch außerhalb der Leguminosen vor: nach RABATÉ **220)** ist eines der 3 aufgefundenen Vincoside aus *Vinca major* und *V. minor* (*Apocynaceae*) mit Robinin identisch.

Rhamnoside. Heteroside mit l-Rhamnose am Aglucon kommen anscheinend viel häufiger natürlich vor, als man früher angenommen hat. Bisher sind zwei Gruppen sicher erkannt. Die eine sind die sog. Anthraglykoside in den purgirenden Rinden von *Rhamnus*-Arten etc., die als Aglucone Anthranole resp. Anthrachinone enthalten. Ferner der Typus des Scillarens in *Scilla,* bei dem das Aglucon den Geninen der Digitalisgruppe nahesteht; auch Flavonderivate als Aglucone scheinen vorzukommen. Immer aber haben anscheinend diese Rhamnoside denselben Typus, daß sie nicht als solche genuin in den Pflanzen vorkommen, sondern daß stets die Rhamnose wieder gebunden ist an eine oder mehrere Glucosen zu Mehrfach-zuckern. Über diese und ihre noch enzymatisch ungeklärte Spaltung haben wir § 342 berichtet; hier haben wir nur noch einiges über die Glykoside als solche nachzutragen.

---

219) ***C. Charaux,*** Dédoubl. bioch. du robinoside. Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 915 (1926). — 220) ***J. Rabaté,*** Prés. du robinoside dans . . . Vinca. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 130 (1933).

Am besten ist bisher eins der Anthraglykoside untersucht, nämlich das aus der Rinde von *Rhamnus frangula* („*Bourdaine*"); es ist aber wohl kaum zweifelhaft, daß in anderen Fällen bei diesen die Dinge ähnlich liegen. Bridel u. Charaux 221) fanden hier einen höheren Komplex, der aus einem Trisaccharid in Bindung an das Aglucon besteht. Das Trisaccharid besteht seinerseits aus 2 Glucose + 1 l-Rhamnose. Das genuine Glykosid ist durch Glucosidase spaltbar, und es verbleibt nach Ablösung der Glucose ein l-Rhamnosid mit dem Aglucon Emodin (1,6, 8-Trioxy-3-Methylanthrachinon). Dieses sekundäre Glykosid bezeichnen die Autoren als **Frangulosid.** Es ist nun wie stets angegeben gegen alle Enzyme resistent.

Das Enzym findet sich auch in der Rinde selbst und bewirkt beim Lagern die spontane Umwandlung des primären höheren Glykosids in Frangulosid. Mit Säuren kann man natürlich das Aglucon frei gewinnen neben drei Moll. Zucker. Daß bei anderen Anthraglykosiden die Dinge ähnlich liegen, dafür spricht, daß dieses sekundäre Glykosid das gleiche ist, wie man es aus *Rhamnus cathartica* schon früher isolirt und als **Rhamnoxanthin** bezeichnet hat; ob auch der genuine Komplex der gleiche ist, ist noch nicht bekannt. Neben diesem aufgeklärten primären Komplex findet sich in *Rh. frangula* noch ein zweites leicht zersetzliches Glykosid, das ebenfalls nur ein l-Rhamnosid ist, und als Aglucon das Frangularol enthält, ebenfalls ein Derivat des Anthrachinons. Es ist **Frangularosid** genannt worden.

Einige weitere Rhamnoside sind bisher zerstreut gefunden worden. So enthält *Orobanche* ein bisher als unspaltbar befundenes Glykosid **Orobanchin.** Jedoch liegen hier die Verhältnisse insofern etwas anders, als schon das genuine Glykosid, das außer Rhamnose auch noch Glucose enthält, unspaltbar sein soll. Im übrigen ist seine Struktur nicht aufgeklärt, wir können noch nicht sagen, ob die Rhamnose am Aglucon sitzt, die Nichtspaltung also darauf zu beziehen ist, oder ob die Glucose heterosidisch gebunden ist und vielleicht andere sekundäre Momente die Spaltung verhindern. Als Aglucon findet sich Kaffeesäure; das Glykosid als solches oxydirt sich an der Luft ohne Spaltung, während sonst meist nicht die Glykoside selbst, sondern nur die freien Aglucone Chromogene sind. Auch bei dem als unspaltbar geltenden Glykosid aus *Buddleia* findet sich Rhamnose + Glucose; Aglucon ist ein Flavonol (**223**).

Endlich findet sich Rhamnose als Zuckerkomponente auf einem ganz anderen Gebiete, nämlich bei giftigen Herz-Glykosiden, deren Aglucone mehrkernige Ringe von ähnlicher Struktur wie die Sterine sind, und bei denen meist ganz andere Zucker interveniren. Es fanden nämlich Stoll c.s. **224—230)** in der Meerzwiebel *Scilla maritima* ein genuines Glykosid **Scillaren A,** das in der nun schon bekannten Weise einen höheren Zuckerkomplex enthält, nämlich die Scillabiose, eine Glucosido-Rhamnose mit der Rhamnose am Aglucon. Die enzymatische Spaltung entfernt auch hier wieder die Glucose und läßt das reine Rhamnosid des Aglucons zurück, das **Proscillaridin A.** Daß Stoll diese Spaltung auf ein Spezialenzym Scillarenase zurückführt, haben wir § 342a besprochen, ebenso daß die durch Säurespaltung isolirte Biose enzymatisch unspaltbar

---

221) ***M. Bridel, C. Charaux,*** Franguloside, C. R., **191.** 1151, 1374; **192,** 1269 (1930/1); Bull. Soc. Chim. Biol., **15,** 642, 648 (1933). — 222) ***M. Bridel, C. Charaux,*** Orobanchine, C. R., **178,** 1339; Bull. Soc. Chim. Biol., **7,** 474 (1925). — 223) ***H. Yü,*** Et. chim. de Buddleia. Bull. Soc. Chim. Biol., **15,** 482, 616 (1933). — 224) ***A. Stoll, W. Kreis,*** Digitalis- und Scillaglucoside. Verh. Schweizer Nat. Ges. **1932,** 331, 435. — 225) ***A. Stoll c.s.,*** Herzaktive Subst., der Meerzwiebel. Helv. Chim. Acta, **16,** 703, 1049 (1933). S.A. — 226) ***A. Stoll, W. Kreis, A. Hofmann,*** Scillarenase. Zs. phys. Chem., **222,** 24 (1933). S.A. — 227) ***A. Stoll,*** Scilla- und Digitalis-glucoside. Pharm. Acta Helv., **9,** 145 (1934). S.A. — 228) ***Ders.,*** Isol. empfindl. Naturstoffe. Mitt. Lebensm. Unt., **25,** 196 (1934). S.A. — 229) ***A. Stoll, A. Hofmann, W. Kreis,*** Scillaridin A. Helv. Chim. Acta, **17,** 1334 (1934). S.A. — 230) ***A. Stoll, A. Hofmann,*** Umsetz. Prod. von Scillaren A. ebd. **18,** 82 (1935). S.A.

ist. Auch das Rhamnosid ist wieder unspaltbar. Durch Säurespaltung erhält man das Aglucon selbst, das Scillaridin A $C_{25}H_{32}O_3$, das den Gallensäuren sehr nahe steht. Denn STOLL **231)** gelangte durch katalytische Hydrirung von Anhydro-scillaridin zu einer Scillansäure, die sich als identisch erwies mit der Allo-cholansäure, dem Stereo-isomeren der Cholansäure. Neben dem Scillaren A findet sich noch ein anderer Komplex Scillaren B.

Heteroside der Digitoxose und verwandter Zucker. Ganz analoge Verhältnisse finden wir bei der großen Gruppe von Herzglykosiden, die sich um die Gifte der *Digitalis* und *Strophantus* herum gruppiren. Hier finden wir verschiedene Zucker, die sich von Methyl-pentosen ableiten, aber eigenartig verändert und z. T. noch nicht strukturell aufgeklärt sind. Die Aglucone sind ebenfalls alle verwandt, es sind Derivate desselben hydrirten Cyclopentenyl-phenanthrens, von dem sich die Sterine und die Gallensäuren ableiten. Diese Aglucone sind in der Hauptsache aufgeklärt, wenn auch noch nicht alle; über die Natur der Zucker herschen noch verschiedene Zweifel, wie über die Struktur der Glykoside überhaupt. Über die Aglucone s. z. B. das Sammelreferat von JACOBS (l. c. 107).

Bei den Glykosiden aus *Digitalis* und *Strophantus* tritt an die Stelle von l-Rhamnose bei *Digitalis* die Digitoxose, bei *Strophantus* und verwandten Glykosiden die Cymarose, ein Methylaether der Digitoxose an C_3 (**231a)**). Ferner kommt noch die ähnliche Sarmentose vor, sowie ein Methylaether einer normalen Methylpentose, Digitalose, in Digitalisglykosiden, doch sind die Glykoside dieses Zuckers (Digitalin) noch nicht näher erforscht.

Digitoxose ist eine 2-Desoxymethylpentose $CH_3 . CHOH . CHOH . CHOH . CH_2 . CHO$; jedoch ist ihre Konfiguration noch nicht völlig klar; man kann also nicht sagen, ob die Resistenz ihrer Heteroside durch die Desoxygruppe in C_2 oder die Konfiguration (l-Rhamnose?) bedingt ist. Daß es die Desoxygruppe nicht sein muß, zeigt das Beispiel der leicht spaltbaren Heteroside der Desoxy-ribose, der Thyminose in den tierischen Nucleinsäuren. — Die Konfiguration der Digitalose ist ebenfalls noch unsicher, es bleiben mehrere Möglichkeiten **(232)**.

Wie § 342*a* ausgeführt, zerfallen nach STOLL c.s. **233)**, **234)**, die genuinen Glykoside der *Digitalis* durch Enzymwirkung unter Abspaltung von Glucose in verschiedene secundäre Glykoside, von denen eines Digitoxin ist; die anderen sind acetylirtes Digitoxin, sowie zwei weitere acetylirte Glykoside mit anderem Aglucon, anstatt Digitoxigenin Gitoxigenin resp. Digoxigenin. Alle enthalten drei Moll. Digitoxose, sie sind völlig resistent gegen Fermente. Spaltet man aber mit Säuren, so werden nur zwei Moll. Digitoxose frei, und es verbleibt eine Biose Digilanidobiose, die je ein Mol. Glucose und Digitoxose enthält und nun ebenfalls unspaltbar ist, wie die Scillabiose. — Ein weiterer Zerfall dieser secundären Glykoside ist nicht bekannt; auf einen Zerfall im Tierkörper (Warmblüterherz) deuten pharmakologische Versuche von STEPPUHN **235)**, die aber chemisch nicht weiter verfolgt sind.

Strophantusglykoside. Hier liegen, wie § 342a berichtet, die Dinge ganz ähnlich. Sie

---

231) ***A. Stoll, A. Hofmann, A. Helfenstein,*** Ident. der α-Scillansäure mit Allocholans. Helv. Chim. Acta, **18,** 644 (1935). S.A. — 231a) ***R. C. Elderfield,*** Cymarose. Sci. **1935**, I, 440. — 232) ***O. Th. Schmidt, W. Zeiser,*** Konfig. der Digitalose. Ber. Chem. Ges., **67,** 2127 (1934). — 233) ***A. Stoll, W. Kreis,*** Genuine Digitalisglyk. Münch. Med. Ws. **1933,** I, 723. S.A.; sowie Bull. Sci. Pharmac., **40,** 321 (1933). S.A. — 234) ***Dies.,*** Genuine Glyk. der Digit. purp. Helv. Chim. Acta, **18,** 120 (1935). S.A. — 235) ***O. Steppuhn, J. Nolle,*** Ferm. Proz. . . . Digitalissubst. Bioch. Zs., **198,** 409 (1928).

Abgeschlossen: 7. 10. 35. Ber. Phys. 87, H. 5/6.

enthalten im genuinen Zustande, z. B. k-Strophantin, an das Genin gebunden eine Biose, Strophantobiose, bestehend aus Glucose + Cymarose. Aus diesen genuinen Glykosiden spalten nun autochthone Fermente der Samen eine Glucose ab und hinterlassen die Cymaroside der Genine, im Fall *Strophantus Kombe* Cymarin = Cymarosido-strophantidin. In anderen Fällen, bei *Strophantus sarmentosus, Periploca graeca,* andere „Cymarine", wie Sarmento-cymarin, Periplo-cymarin, die wieder andere Biosen und andere Monosen (Sarmentose) enthalten; alle diese Biosen sind frei noch nicht isolirt. Die Cymarine selbst, also die sekundären Monoglucoside der Cymarose, gelten bisher als enzymatisch unspaltbar.

Da auch bei anderen Herzglykosiden die Genine alle diesen sehr ähnlich sind, und alle den Bau von polycyclischen, den Sterinen und Sexualhormonen verwandten Stoffen haben, so werden wohl bei diesen Glykosiden die enzymtypischen Verhältnisse analog liegen; jedoch ist Näheres darüber noch nicht bekannt.

Nur bei der Frage nach der Natur der Glykoside von *Nerium Oleander* beginnt sich die Sachlage zu klären. Diese waren bisher nur mangelhaft charakterisirt. Wie § 341 bereits angedeutet, hat TANRET (l. c. 49) eine Spaltbarkeit von Neriin und Oleandrin, langsam durch Mandelemulsin, schnell durch Saft von *Helix* festgestellt. Dabei soll neben einem nicht identifizirten Zucker Glucose abgegeben werden. Andererseits ist durch WINDAUS (1925) bekannt, daß das Genin dieser Glykoside mit Digitaligenin identisch ist.

Die Spaltung von TANRET scheint ähnlich zu verlaufen wie hier von den Digitalis-glykosiden ausgesagt: es scheinen durch Fermente unter Abspaltung von Glucose sekundäre Glykoside zu entstehen, die dann enzymatisch unspaltbar sind. Ein solches Glykosid hat anscheinend FLURY **236)** in seinen **Folinerin** isolirt. Es ist rein und kristallisirt und hat die Formel $C_{29}H_{46}O_8$. Auf Enzymspaltung nicht geprüft. Säurespaltung liefert neben einem noch nicht identifizirten Zucker ein Genin Oleandrigenin $C_{23}H_{36}O_6$, das mit Gitaligenin isomer ist und wie dieses durch Abspaltung von 3 Moll. Wasser in Digitaligenin übergeht.

Der Zucker ist vielleicht nach der anzunehmenden Formel $C_6H_{12}O_3$ und dem nachgewiesenen Methoxyl ein niederes Homologes der Cymarose und Sarmentose (Priv. Mitt.).

Da auch die Saponine z. T. ähnliche chemische Verhältnisse zeigen, so ist es möglich, aber an der Hand der sehr spärlichen Daten noch nicht zu sagen, daß bei den Glykosiden von *Caulophyllum thalictroides* sich ähnliche Vorgänge abspielen. Nach DAVY **237)** entsteht beim feuchten Lagern der Droge aus einer vorher nicht kristallisirenden Masse ein Gemisch eines kristallisirten mit einem nicht kristallisirenden Glykosid, die aber mit den früher beschriebenen, Caulosaponin und Caulophyllosaponin, nicht ganz identisch sind. — Bei anderen Saponinen hat man enzymatische Spaltung beobachtet, sie enthalten z. T. Arabinose (H. W. S. 632, *l. c. 825, 826*).

2) Glucuronidasen.

Ein weiteres noch kaum erschlossenes Gebiet ist das der enzymatischen Zerlegung von Glykosiden, die anstelle der Zucker Uronsäuren enthalten. Da diese Uronsäuren viel häufiger in der Natur vorkommen, als man früher angenommen hatte, auch in Polyosen wie den Pectinen, den Kohlenhydraten der Algen etc., sowie auch in natürlichen Heterosiden, so sind diese Enzyme ebenfalls wichtiger als man bisher wußte, und der weitere Ausbau dieses Gebietes von Interesse.

Schon früher waren einige wenige Spaltungen synthetischer Glucuronide durch Mandel-emulsin und ähnliche Präparate beobachtet worden (H.W. S. 603), jedoch hatte man diese Spaltungen ohne weiteres der β-Glucosidase zugeschrieben. BERG-

---

236) ***F. Flury, W. Neumann,*** Folinerin. Klin. Ws., **1935**, I, 562. S.A. — 237) ***E. D. Davy, H. P. Chu,*** Glucosides of Caulophyllum. Jl. Amer. Pharm. Assoc., **16,** 302 (1927); BPh **44,** 521.

MANN 238) weist indessen darauf hin, daß in diesen Fällen niemals die Entstehung von Glucuronsäure tatsächlich nachgewiesen worden ist. Ein von ihm hergestelltes Glucuronid des β-Naphtols erwies sich gegen alle Enzyme als resistent, auch gegen die natürliche Glucuronide spaltende Baicalinase (s. u.). Auch Borneolglucuronsäure ist nach älteren Angaben unspaltbar (H.W. S. 603, *l. c. 581*).

Es ist indessen mit moderner Methodik die Zerlegung anderer Glucuronide sichergestellt worden. ISHIDATE 239) fand sie bei den Glucuroniden des Menthols und Campherols, was DA CRUZ 240) und HELFERICH 241) für Menthol-glucuronsäure bestätigt haben. Aber diese Spaltung ist nach HELFERICH nicht der Glucosidase des Emulsins zuzuschreiben, sondern einem eigenen Enzym, einer **Glucuronidase**. Dieses Enzym geht bei den üblichen Reinigungsmethoden des Emulsins nicht mit der Wirkungssteigerung der Glucosidase mit, sondern verhält sich anders. Prüfte man den Effekt der Reinigung am Menthol-glucosid, so beobachtete man eine Steigerung der Wertigkeit von 0,11 auf 0,85 (bei Phenol-glucosid von 0,35 auf 3,3). Am Glucuronid gemessen stieg sie aber nur von 0,0022 auf 0,0056. Es ist also im Mandel-emulsin ein besonderes sehr schwach wirkendes Enzym vorhanden, dessen opt. ph = 5,0 ist.

Ein entsprechendes Enzym fand dann MASAMUNE 242) in Nierengewebe (Rind). Es läßt sich durch Autolyse freilegen und mit Alkohol ausfällen. Es ist wirksam auf Glucuronide von Phenol und Menthol, opt. ph = 5,3 — 5,6.

Das Enzym ist sehr unbeständig, wird durch Alkohol, Aceton, Trocknen fast völlig vernichtet, ist auch gegen Erwärmen empfindlicher als Emulsin. Es wird ferner gehemmt durch Glykol und Glycerol. Es greift weder Glucoside noch α-Glucuronide an. Die enzymatisch entstehende Glucuronsäure konnte quantitativ erfaßt werden. Diese Befunde wurden von OSHIMA 243) erweitert. Er fand beim Stier das Enzym sehr reichlich in der Milz und den endokrinen Organen, weniger in Lunge, Niere, Leber; Blut und sonstige Organe enthalten sehr wenig. Beim Hund fehlt es im Blut, Gehirn, Magen, Herz; wenig in den meisten anderen Organen; reichlich nur wieder in Milz und endokrinen Organen.

Eine ganz andere Sachlage soll nach MASAMUNE 244) bei der einfachen **Benzoyl-glucuronsäure** vorliegen. Da diese bei ph = 8,6 Mutarotation zeigt, so kann das Benzoyl nicht in 1 sitzen; es handelt sich also nicht um diejenige Form der Bindung, die wir bisher bei allen Glykosiden betrachtet haben. Das Benzoyl muß vielmehr an einer der alkoholischen OH-Gruppen, 2 oder 4, sitzen. Es handelt sich also hier um einen Ester, allerdings mit einem Zuckeralkohol. Da ein Enzym aus Niere diesen Ester spaltet, so liegt die Vermutung nahe, daß es sich einfach um eine „Lipase" handelt. Jedoch läuft die Spaltung der von Tributyrin nicht parallel. Gegen eine einfache Gewebslipase spricht auch der optimale ph von 5,4—5,8. M. bezeichnet das Enzym provisorisch als „Glykuronidase", ohne über seine Stellung im System etwas vorwegnehmen zu wollen.

Diese Versuche an synthetischen Glucuroniden und dazu passenden Fermenten gewinnen nun dadurch eine biologische Bedeutung, daß solche spaltbaren Glykoside natürlich vorkommen. Dies gilt ja in gewissem Sinne auch für die bisher angeführten, weil ja auch z. B. Menthol-glucuronsäure natürlich entsteht, eben als Entgiftungsprodukt

---

238) ***F. Bergmann,*** Enzym. Verh. von Glucuroniden etc. Bioch. Zs., **267**, 296 (1933). — 239) ***M. Ishidate,*** Campherol-glycur. acid. Jl. Pharm. Soc. Japan **49**, 56 (1929). — 240) ***A. da Cruz,*** Struct. stéréoch. de l'ac. menthol. glucuron. etc. Soc. Biol. **105**, 815; BPh **60**, 251 (1930). — 241) ***B. Helferich, G. Sparmberg,*** Spalt. von d-Glucuroniden etc. Zs. phys. Chem. **221**, 92 (1933). S.A. — 242) ***H. Masamune,*** Enz. which katal. the hydrol. of osides of glucur. acid. Jl. of Biochem., **19**, 353 (1934). — 243) ***G. Oshima,*** On β-Glucuronidase. Jl. of Biochem. **20**, 361 (1934); BPh **85**, 162. — 244) ***H. Masamune,*** Constit. of benzoylglucuronic acid etc. Jl. of Biochem., **20**, 311 (1934); BPh **84**, 4.

von in den Tierkörper eingeführtem Menthol. Man könnte also daran denken, daß diese im Tierkörper gefundenen Enzyme etwa bei der entgiftenden Synthese mitwirken; jedoch ist darüber experimentell noch nichts bekannt.

Es kommen aber auch Glucuronide natürlich in Pflanzen vor, sowie darauf eingestellte Enzyme; ob diese einheitlich und mit den bisher beschriebenen Glucuronidasen identisch sind, steht noch nicht fest. Am besten bekannt ist bisher der Fall des Baicalins und der darauf eingestellten **Baicalinase**. Sowohl das Glykosid wie das Enzym sind von SHIBATA **245)** entdeckt und benannt worden. Baicalin findet sich in den Wurzeln von *Scutellaria baicalensis Georgi*. Es enthält als Zucker d-Glucuronsäure, als Aglucon das Baicalein, ein 5,6,7-Trioxyflavon. Ferner findet sich in auch oberirdischen Teilen verschiedener *Scutellaria*-arten ein sehr nahe verwandtes Glucuronid Scutellarin (MOLISCH 1901), das als Aglucon 5,6,7,4′-Tetra-oxyflavon enthält. Diese beiden Glucuronide und nach MIWA **246)** nur diese werden von dem Enzym Baicalinase in *Scutellaria* gespalten. Alle anderen bisher untersuchten Glykoside sind resistent, auch die Glucuronide von Menthol und Naphtol, ebenso die Flavon-glucoside wie Rutin und Robinin. Umgekehrt ist Baicalin gegen alle β-Glucosidasen resistent, sowohl gegen Mandel-emulsin wie gegen „Rhamno-diastase" und Taka.

Darstellung des Enzyms durch Extraktion der Wurzeln mit 70%igem Glycerol, Adsorption an Kaolin in schwach essigsaurer Lösung, Elution mit verdünnten NH_3 (0,05%). Klärung durch Filtration über wenig Kieselgur. Ansäuern auf ph = 6, Einengen.

Optimale Temperatur 50—60°, darüber dann schnelle Zerstörung. (Abb. 31). Der Temperaturkoeffizient Q_{10} erwies sich bei dem niederen Temperaturbereich als groß, um beim höheren rasch abzunehmen.

Optimaler ph = 6, bei Scutellarin etwas nach sauer verschoben (Abb. 32).

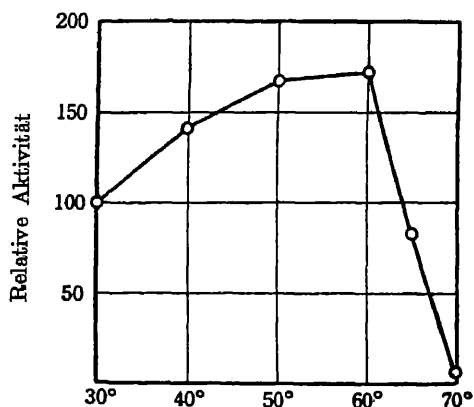



Abb. 31.
Temp.-Aktiv.-Kurve der Baicalinase nach **346)**

Aktivitäts-ph-Kurve der Baicalinase nach **346)**

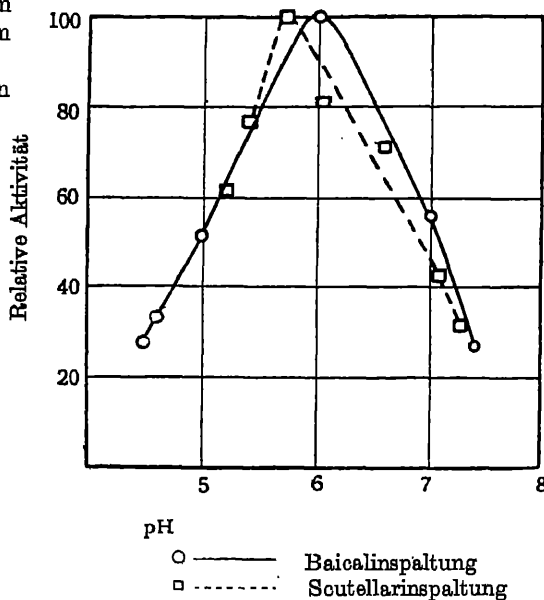



Abb. 32.

245) ***K. Shibata, Sh. Hattori,*** Glukurons.-Bind. im Baicalin. Acta phytochim. (Tokyo) **5**, 117 (1931). — 246) ***T. Miwa,*** Baicalinase. Acta phytochim. (Tokyo), **6**, 155 (1932),; **8**, 231 (1935). S.A.

Die Reaktion der Spaltung ist monomolekular. Reakt.-Geschw. in weiten Grenzen proportional der Enzymmenge (Abb. 33). **Baicalinaseeinheit** (B.E.) diejenige Menge des Enzyms, welche unter obigen Versuchsbedingungen einen k-Wert von 0,01 ergibt.

Die Hauptaffinität richtet sich gegen Baicalin, Scutellarin wird dreimal langsamer gespalten.

Ein allerdings vorläufig als unspaltbar angegebenes Uronid enthält nach Yü 247) *Buddleia*. Aglucon ist ein Homologes des Brenzkatechins (Ortho-dioxybenzols).

Dagegen ist das Vorhandensein einer Uronsäure in dem Glykosid Glycyrhizin aus *Glycyrhiza glabra* nicht sicher nachgewiesen. Das Glykosid ist gegen alle Enzyme, auch gegen Baicalinase resistent (BERGMANN 238)). Nach SHINODA 248) enthält *Glycyrhiza* ein Glykosid Liquiritin, das Glucose enthält und als Aglucon ein 4',7-Dioxy-flavon

Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge der Baicalinase nach 846).

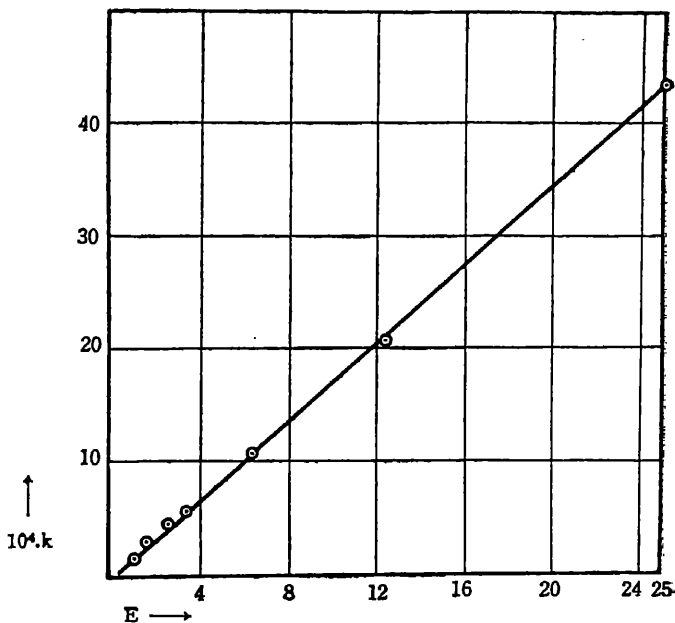



Abb. 33. Substrat: Baicalin; pH: 6.0; Temperatur: 30°.
Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit in 10^4.k.
Abszisse: Relative Enzymmenge (E).

3) Thioglucosidasen.

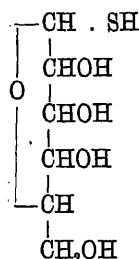
§ 363. Ebenso wie das klassische Emulsin hat sich nunmehr auch das klassische „**Myrosin**", das die Glucoside des Typus Sinigrin zerlegende Ferment, als eine Mischung verschiedener Fermente herausgestellt. Dies ist nunmehr nach Vorarbeiten von v. EULER c. s. durch präparative Trennung bisher zweier Enzyme durch NEUBERG c. s. 249) sichergestellt. Über das eine Teilferment, die im Myrosin enthaltene Sulfatase, die v. EULER erkannt und NEUBERG **Myrosulfatase** genannt hat, ist § 295 berichtet worden. Dieses Enzym spaltet aus dem Gesamtkomplex des Sinigrins Schwefelsäure ab und läßt das nunmehr keine Schwefelsäure mehr enthaltende Thioglucosid Merosinigrin zurück. Ob noch weitere Partialfermente im Myrosin enthalten sind, wie NEUBERG vermutet, läßt sich noch nicht sagen.

Hier haben wir es nur mit dem zweiten wesentlichen Partialferment des Myrosins zu tun, der **Thioglucosidase**, das die Bindung zwischen dem Aglucon und dem Zucker löst, also unter Abspaltung der Isocyanat-gruppe Thioglucose freisetzt. Dies ist eine

---

247) ***H. Yü,*** Et. chim. de Buddleia. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 482, 616 (1933). — 248) ***J. Shinoda, S. Ueeda,*** Flavanon-glucosid in Glycyrrhiza. Ber. Chem. Ges., **67**, 434 (1934). — 249) ***C. Neuberg, O. v. Schönebeck,*** Teilferm. der Myrosinase. Bioch. Zs., **265**, 223 (1933). S.A.; s. a. ***C. Neuberg, J. Wagner,*** Zerleg. des myrons. Kaliums durch animal. Sulfatase. Zs. exp. Med. **56**, 333 (1927). S.A.

Glucose mit der Thiolbindung anstelle des im Lactolring gebundenen OH; der Schwefelzucker wird von SCHNEIDER 250) nunmehr **Glucothiose** genannt.

```
┌─CH . SH
│  |
│  CHOH
O  |
│  CHOH
│  |
│  CHOH
│  |
└─CH
   |
   CH₂OH
```

Die Formel der Glucothiose sei aus dem H.W. S. 638 wiederholt; der Zucker hat zweifellos die Konfiguration der d-Glucose, aber es ist auch heute noch nicht völlig sicher, ob die Bindung in C_1 α oder β ist. WREDE (*l. c. 858*) hatte dem Glykosid die α-Konfiguration zugewiesen, da eine von ihm synthetisch erhaltene β-Thioglucose nicht mit dem aus dem Sinigrin entstehenden Zucker identisch ist. Jedoch ist diese Folgerung nach SCHNEIDER c. s. 250) nicht richtig. Sie haben aus dem Na-Salz einer zweifellosen β-Glucothiose das β-Äthyl-glucothiosid hergestellt. Aus den optischen Werten und der Mutarotation folgern sie, daß die α-Form viel höher positiv drehen muß (über 100°) als die β (+ 16,5). Da nun die natürliche Thioglucose aus Sinigrin eine Anfangsdrehung nach links zeigt, so kann sie nicht α sein. Es gelang dann auch die Reindarstellung der α-Form (über die Pentacetylverbindung): α-Thioglucose hat eine Drehung von + 213°, noch viel stärker dreht das entspr. Disulfid. Außerdem gelang es, durch Spaltung des Sinigrins mit NaOH und Oxydation direkt zum bereits aus der Synthese bekannten β,β-Diglucosyl-disulfid zu gelangen. Die Konfiguration der Thioglucoside ist also zweifellos β. Wenn trotzdem bei der Entschwefelung der natürlichen Glucothiose ebenso zweifellos α-Glucose entsteht, so liegt hier eine WALDEN-Inversion vor, denn auch reine β-Glucothiose liefert dabei α-Glucose, ebenso auch die einfachen Alkyl-glucothioside, während entsprechend α-Alkylglucoside bei der Entschwefelung mit $HgCl_2$ β-Glucose liefern.

Herstellung von Sinigrin: Ein Verfahren von HÉRISSEY 251), von SANDBERG 252) verbessert, verfährt wie folgt: Schwarze Senfsamen werden mit der 10fachen Menge 70%igem Aceton gekocht; filtriren, einengen, mit Wasser das Aceton abtreiben, dann vergären. (Entfernung der Saccharose). Neutralisiren, einengen. Mehrfach mit Alkohol behandeln, schließlich aus Alkohol umkristallisiren.

Mikrochemischer Nachweis der Senföle in Pflanzen. Neue Methode von PIETSCHMANN 253): das Destillat wird in konz. NH_3 aufgefangen und nach Stehenlassen der entstandene Alkyl-thioharnstoff bestimmt. Mit dieser Methode Auffindung in vielen Pflanzen, stets in allen Teilen; so in vielen Cruciferen, ferner *Reseda, Tropäolum, Petiveria alliacea* (*Phytolaccaceae*). Nach Untersuchungen an *Alliaria officinalis* enthalten junge Pflanzen überall die Glykoside, beim Altern wandern sie in die Samen aus.

Sinigrin findet sich nach HEIDUSCHKA 254) meist nur wenig in unzersetzter Form, dagegen findet sich das Enzym in den meisten Pflanzenteilen. Den höchsten Gehalt zeigte *Cochlearia armoracea* (Meerrettich), den niedersten die Kohlrübe (*Brassica napus esculenta D. C.*); zwischen diesen die Stoppelrübe (*Brassica rapa escul. Koch*); Runkelrüben enthalten weder Sinigrin noch ein Senföl, auch kein Enzym.

Sonstige Thioglucoside: neuere Angaben über Struktur, Vorkommen etc. habe ich nicht auffinden können.

Darstellung des Enzyms Myrosin ungetrennt: nach dem Verfahren von GUIGNARD erhielt ein Präparat BRAECKE 255) aus weißen Senfsamen mit Wasserextraktion, fraktionirter Fällung mit Alkohol und Waschen mit Äther. Ähnlich verfährt HEIDUSCHKA 254).

---

250) ***W. Schneider c. s.***, Schwefelzucker etc. Ber. Chem. Ges. **61**, 1244; **62**, 1384; **63**, 2787; **64**, 1319, 1321 (1928—1931). — 251) ***H. Hérissey, R. Boivin***, Prépar. du sinigroside. Bull. Soc. Chim. Biol., **9**, 947 (1927). — 252) ***M. Sandberg, O. M. Holly***, Myrosin. Jl. of Biol. Chem., **96**, 443 (1932). — 253) ***A. Pietschmann***, Mikroch. Nachw. der Senföle. Mikrochem., **2**, 33 (1924). — 254) ***A. Heiduschka, C. Pyriki***, Myrosin und Sinigrin. Arch. der Pharmac., **264**, 693 (1926). — 255) ***M. Braecke***, Emploi des ferm. . . . pour . . . l'ét. des glucosides. Jl. de pharmac. Belge, **10**, 479 (481) (1928).

Trennung von der Sulfatase, freilich unter sehr großen Verlusten, gelang NEUBERG **249)**, und zwar durch auswählende Adsorption. Die Adsorption an sich ist zwar immer bei beiden Enzymen gleich stark, jedoch gelingt es, bei manchen Eluaten die Thioglucosidase anzureichern. Schließlich konnte eine Lösung erhalten werden, die in 24 h ohne jede sulfatatische Wirkung Sinigrin immerhin noch zu 20% zerlegt (vgl. dazu § 295, wo die Gewinnung umgekehrt reiner Sulfatase angeführt ist).

Das Enzym ist noch wenig untersucht; bei ph = 3 geht es nach NEUBERG zu grunde, ist aber bei alkalischem ph beständiger als die Sulfatase; die Temperaturbeständigkeit ist etwas größer als die der Sulfatase.

Nachtrag zum VIII. H.T.

Zu S. 319. Die Vorgänge bei der enzymatischen Spaltung des **Robinins** verlaufen nach ZEMPLÉN **256)** anders, als sie CHARAUX (l. c. 219) dargestellt hat. Bei der Enzymspaltung wird nicht das Aglucon (Kaempferol) in freiem Zustande abgespalten, so daß das Trisaccharid Robinose ebenfalls frei wird. Die Enzymspaltung liefert vielmehr neben einem secundären Glykosid mit l-Rhamnose, also einem l-Rhamnosido-Kaempferol, eine Biose, die ZEMPLÉN **Robinobiose** nennt. Das secundäre Rhamnosid ist wie üblich enzymfest. Robinobiose ist eine l-Rhamnosido-d-galactose; über ihre weitere Zerlegung (§ 334) ist hier noch nichts Näheres angegeben. Damit ist auch das Trisaccharid **Robinose** ebenfalls aufgeklärt als l-Rhamnosido-d-galactosido-l-rhamnose. Es sitzt also eine l-Rhamnose am Aglucon, und die Spaltung des primären Glykosids erfolgt durch eine Galactosidase, wohl sicher β. In bezug auf die Freisetzung eines secundären Glykosids der l-Rhamnose schließt sich also nunmehr die Spaltung des Robinins eng an die Sachlage bei den anderen l-Rhamnosiden an; nur wird hier nicht eine Glucose abgespalten, sondern von der l-Rhamnose eine Biose abgelöst, eben Robinobiose gleich l-Rhamnosido-d-galactose.

---

256) ***G. Zemplén, A. Gerecs,*** Robinobiose etc. Ber. Chem. Ges. **68**, 2054 (1935).

IX. Hauptteil.

Polyasen

ZUR EINFÜHRUNG: DER AUFBAU DER POLYOSEN *).

§ 364. Mit dem Kapitel Polyasen betreten wir zum ersten Male das Gebiet des enzymatischen Abbaus hochmolekularer Naturstoffe und sehen uns damit vor Schwierigkeiten gestellt, die wir in den vorangegangenen Darlegungen nicht erfahren haben. Dort hatten wir es wenigstens bei den Substraten der Enzymwirkung mit ganz einfachen organischen Stoffen genau definirter Natur zu tun, und nur gelegentlich, wie bei einigen Holosiden, hatten wir Strukturprobleme engerer Art zu behandeln, wie bei der Turanose und den β-Glucosiden des Isomaltosetypus. Hier aber stehen wir vor einem ganz neuen Problem. Die Enzymwirkungen sind hier nicht einmal im Grossen zu ordnen, solange wir nicht über die Struktur der hochpolymeren Substrate wenigstens grundsätzliche Kenntnisse haben. Es kann natürlich hier nicht unsere Aufgabe sein, das ganze in den letzten Jahren in beispielloser Weise entwickelte Gebiet der Chemie der hochmolekularen Stoffe auch nur im Fluge zu durcheilen, wir müssen uns mit dem begnügen, was für unser Thema, die Aufklärung der enzymtypischen Verhältnisse: Natur und Wirkungsart der beim Abbau tätigen Fermente — hier der Polyasen, später der Proteasen — unentbehrlich ist. Aber selbst bei dieser Beschränkung auf das Notwendigste müssen wir doch eine Reihe der wichtigsten Fragen besprechen, wenn wir — soweit dies heute schon möglich ist — zum Verständnis der Enzyme und ihrer Wirkungen vordringen wollen.

Nur als ein Beispiel sei vorweggenommen: ebenso wie bei den Proteinen gibt es Fermente bei den Polyosen, die primär auf den kolloiden hochmolekularen Naturstoff wirken, Amylase bei Stärke, Cellulase bei Cellulose etc. Die Natur dieser Enzyme hängt nun absolut davon ab, wie diese Naturstoffe letzten Endes zum Kolloid aufgebaut sind. Sind diese hochmolekularen Gebilde Strukturgebilde mit echten Hauptvalenzen, so müssen auch die dazugehörigen Enzyme auf die strukturirten langen Ketten eingestellt sein, d. h. sie müssen chemisch abbauend, Ketten verkürzend wirken; sind aber die Kolloide strukturell kleinere Bausteine, zum Kolloid aufgebaut durch

---

*) Zusammenfassende Darstellungen 1—5).

1) ***R. O. Herzog c.s.***, Hochmolek. Verbind. Hb. der Bioch., Ergänz.-Bd., Jena 1930, sowie ***A. van der Wijk***, ebenda, Ergänz.-Werk Bd. I (1933). — 2) ***K. H. Meyer, H. Mark,*** Aufbau der hochmol. Naturstoffe. Leipzig 1930. — 3) ***H. Pringsheim,*** Polysaccharide, III. Aufl., Berlin 1931; sowie im Hb. der Bioch., Ergänz.-Werk Bd. I, Jena 1933. — 4) ***H. Staudinger,*** Die hochmol. organ. Verbind., Berlin 1932. — 5) ***M. Samec,*** Kolloidchemie der Stärke, Dresden 1927.

Association infolge von Nebenvalenzen resp. VAN DER WAALS'sche Kräfte, so wäre ihre erste Zerlegung eine Desaggregation in die eigentlichen Strukturelemente durch besondere darauf eingestellte Fermente, eben desaggregirende Fermente. Im ersteren Falle wären die Enzyme sehr nahestehend denen, die dann die kürzeren Ketten zu Ende spalten, im letzteren Falle vermutlich Enzyme ganz anderer Art. Besteht z. B. die Cellulose aus nichts anderem, als ins Gigantische gedehnten Ketten von β-Glucose in Cellobiose-Bindung, so wird auch die Cellulase in ihrer Natur sehr ähnlich sein der Cellobiase; vielleicht sogar von ihr nur durch relative Spezifität oder durch andere Träger bei gleicher Wirksubstanz geschieden sein (§ 300). Wir sehen also, daß nicht nur im Einzelnen zur Erkenntnis der Abbauphasen die Aufklärung des Baus der Polyosen die Vorbedingung ist, sondern schon ganz generell zur Erkenntnis des Grundtypus der beim Abbau beteiligten Fermente.

Diese Frage, die wir hier beispielmäßig angeschnitten haben, um gleich auf die Natur der Enzyme selbst Bezug zu nehmen, ist nun aber tatsächlich die Haupt- und Kernfrage des Aufbaus der hochmolekularen Naturstoffe, gleichgiltig ob sie durch Fermente spaltbar sind oder nicht.

Diese Probleme haben in den letzten etwa 10 Jahren eine erstaunlich schnelle Entwicklung genommen. Im H.W. S. 641 konnten wir grade noch das Aufdämmern neuer Ideen zur Kenntnis nehmen, welche die ältere, eigentlich ohne viel Nachdenken als selbstverständlich angenommene Lehre von den Polyosen als langen Strukturketten von Monosen resp. Biosen abzulösen schienen. Im „Lehrbuch der Enzyme" (1927) standen diese Vorstellungen in vollem Flor und schienen durch BERGMANN, KARRER, PRINGSHEIM, HESS, in gewissem Sinne auch RICH. KUHN, zum Siege geführt zu sein. Es schien gesichert, daß die Polyosen aus ganz kleinen Strukturbausteinen bestehen, die nun nicht mehr durch weitere normale Hauptvalenzen, sondern durch Kräfte von Molekül zu Molekül (Molekularvalenzen, Nebenvalenzen, VAN DER WAALS'sche Kräfte) zum kolloiden Aggregat geformt sind. Auf der Naturforscherversammlung 1926 begann aber schon der Umschwung, durch das Eingreifen WILLSTÄTTER's und vor allem STAUDINGER's, der seither in einer Reihe bewundernswerter Arbeiten — ebenso bewundernswert durch Breite wie durch Tiefe — jedenfalls den Teil seiner Auffassung zum Siege geführt hat, der die kleinen Bausteine ausschaltet und in den Polyosen wie in anderen Naturstoffen (Kautschuk, Harze, Lignine etc.) lange Strukturketten annimmt. Dieser Anschauung haben sich fast alle maßgebenden Forscher angeschlossen; eigentlich ist es nur noch HESS, der in gewissem Sinne — bei der Cellulose — an den kleinen Bausteinen festhält. Differenzen, die noch vorliegen, sind an sich wichtig genug, aber nicht principiell durchgreifend, wir kommen darauf gleich zurück. Hier sei nur ganz flüchtig, um uns bei den einzelnen Darlegungen nicht wiederholen zu müssen, und ohne Eingehen auf Einzelheiten das ganz allgemeine Problem dargestellt. Die Kernfrage des ganzen Problems ist die: welche Arten von Bindungskräften kommen in Frage, um den stets kolloiden Zustand dieser hochmolekularen Naturstoffe zu deuten? Sind es nur die Hauptvalenzen der klassischen Strukturlehre oder treten noch Kräfte anderer Art hinzu, die man allgemein als intermolekulare Kräfte bezeichnen kann?

Denn das ist eben für die hier zu betrachtenden Naturstoffe das Charakteristikum: sie können nicht nur wie andere Stoffe unter bestimmten Bedingungen als Kolloide auftreten, sondern sie sind stets und unter allen Umständen Kolloide; es sind die „kolloiden Stoffe" an sich, Eukolloide (WO. OSTWALD, STAUDINGER). Es müssen hier also Bedingungen besonderer Art gegeben sein, die es veranlassen, daß selbst bei

der feinstmöglichen Verteilung dieser Stoffe in Wasser — andere Lösungsverhältnisse als Hydrosole kommen ja biologisch nicht in Frage — immer noch so relativ grobe Teilchen zurückbleiben, daß die „Lösung" eben tatsächlich keine echte Lösung ist, sondern alle Kriterien eines lyophilen Sols mit seinen optischen und elektrischen Erscheinungen, seiner Viscosität etc., sowie seinen Fällungsbedingungen der gelösten Teilchen aufweist. Andere solche Naturstoffe sind überhaupt in Wasser unlöslich, wie die Cellulose, und zeigen im festen Zustande eine ausgesprochene Faserstruktur, die wieder mit ihrem chemischen Bauplan zusammenhängt.

Zur Klärung dieser Frage hat die modernste Chemie nicht nur die rein chemisch-analytische und synthetische Forschungsmethode, sondern auch allerlei physiko-chemische Methoden und die direkte Strukturuntersuchung mit Hilfe der Röntgendiagramme in ausgiebigstem Maße herangezogen. Was uns hier besonders interessirt, ist der Umstand, daß auch fermenttypische Untersuchungen zur Klärung beigetragen haben. Diese Forschungen haben sich so weit in das Theoretische gedehnt, daß sie eigentlich drei Grundprobleme auf einmal zu bearbeiten gezwungen sind, nämlich die Struktur der Naturstoffe an sich, die Einordnung der Kolloide in das System der Strukturchemie und endlich eine neue Klärung und Präzisierung des klassischen Molekülbegriffs. Alle diese Forschungen mußten natürlich ausgehen von der Tatsache, daß die Polysaccharide — und ebenso die Proteine — durch das relativ milde Mittel der einfachen Hydrolyse, durch schwache Säuren oder eben specifische Fermente, in bestimmte Bausteine zerfallen. „Bausteine", das will sagen, daß diese Gruppirungen — Zucker oder Aminosäuren — nicht gewaltsam und künstlich aus dem großen Naturgebilde herausgeschlagen werden, sondern darin schon — in anhydrischer Form — vorgebildet sind, und sich nur unbedeutend umgeformt — Aufnahme von Wasser — durch Lösung relativ schwacher Bindungen in Freiheit setzen lassen, und zwar bei Anwendung dieser milden Mittel immer in derselben Form, wenigstens auf den ersten Blick. Daß es nicht immer genau dieselbe Form ist, in der man die Bausteine erhält, hat einerseits die rein chemischen Probleme komplicirt, andererseits aber haben grade diese je nach den Bedingungen verschiedenartigen Spaltprodukte wesentlich zur Klärung der Grundfragen beigetragen.

Neben dieser Eigenschaft, bei der Zerlegung im großen und ganzen jeweilig immer dieselben Spaltprodukte zu liefern, sind die Hochpolymeren auch durch eine Reihe in ihrer Zusammengehörigkeit einzig dastehender Merkmale charakterisirt, die sie als eine ganz besondere, wesentlich neue Körperklasse im System der Chemie erscheinen lassen. In kurzem ist ihre Charakteristik beruhend in folgenden Eigenschaften: es sind unlösliche Stoffe, die niemals in echte, nur z. T. in Wasser in kolloidale Lösung übergehen. Sie sind auch sonst nicht aus dem festen Zustande herauszubekommen, weder durch Schmelzen, noch durch Verdampfen, bei jeder solchen Maßnahme zersetzen sie sich. Im festen Zustande sind sie aber auch nicht in ausgebildeten Kristallen zu erhalten, es sind deformirbare, scheinbar amorphe Stoffe; nur die Röntgendiagramme zeigen, daß sie mikrokristallin gebaut sind, ganz oder durchsetzt mit amorphen Anteilen. Sie zeigen also gemeinsame physikalische Eigenschaften, die mit den aufgeführten Grundeigenschaften zusammenhängen, so Quellung, Dispergirung, Viskosität, Plastizität, Elastizität. Dazu kommt nun aber die chemische Zusammengehörigkeit: es sind nicht eigentlich Stoffe mit hohem „Molekül" im strengsten Sinne der klassischen Definition (s. u.), sondern „hochpolymere Stoffe". Das will sagen, sie bestehen aus einer Zusammenfügung kleiner Moleküle, der „Bausteine"; oder besser, da diese Moleküle bei ihrer gegenseitigen Bin-

dung je ein H resp. OH einbüßen, also keine kompletten Moleküle mehr sind, aus „Baugruppenrümpfen", die in periodischer Folge aneinandergeheftet sind. v. D. WIJK (l. c. 1) faßt die Definition wie folgt zusammen: *„Die Hochpolymeren sind unlösliche, leicht deformirbare, periodisch aufgebaute Festkörper, deren Dampfspannung unmeßbar klein ist, und die nicht als Einzelkristalle auftreten."*

Damit war der erste Teil des Problems gelöst, und es entstand nun die zweite Frage, in welcher Weise diese einzelnen Bausteine nun ihrerseits zu dem Naturkomplex zusammengekittet sind. Die erste und einfachste Ansicht nahm hierbei ganz normale Strukturbindungen an. Nehmen wir das Beispiel der Stärke, so wissen wir, daß sie durch Säurespaltung nichts anderes ergibt, als Glucose $C_6H_{12}O_6$. Wendet man aber statt dessen das Ferment Amylase an, so erhält man nicht einfache Glucose, sondern Maltose $C_{12}H_{22}O_{11}$. Es lag also sehr nahe, die Stärke so aufzufassen, daß eine bestimmte, zwar nicht bekannte, jedenfalls aber große Reihe von Glucosemolekülen in Maltosebindung unter jeweiligem Wasseraustritt sich zu einer Kette zusammenfügt, die bei Abschluß dieses zahlenmäßig bestimmten Verknüpfungsvorganges nunmehr das Molekül Stärke darstellt. Da jedesmal zwischen zwei Zuckern ein H_2O austritt und aus der Formel verschwindet, so war bei Annahme einer genügend langen Kette auch die empirische Formel der Stärke, nämlich $(C_6H_{10}O_5)^x$ berechtigt, da die einzigen nach dieser Formel überschießenden H_2O an den beiden Enden der Kette bei genügender Zahl der Glieder analytisch verschwinden müssen. Diese Vorstellung entsprach absolut dem Stande der chemischen Theorie, eine andere aufzustellen war derzeit gar nicht möglich, und so wurden die ihr innewohnenden Schwierigkeiten gar nicht beachtet; sie wurden eigentlich gar nicht ernstlich diskutirt. Erst die moderne Chemie, die sich gewöhnte, räumlich zu denken, mußte die Vorstellung einer fast eindimensionalen Erstreckung eines „Moleküls" von Neuem prüfen; ebenso wie das Einsetzen einer erneuten Betrachtung des klassischen Molekülbegriffs dahin führen mußte, ein „Stärkemolekül" kritisch anzusehen, das aus einer sehr langen Kette von Traubenzuckerresten besteht, ohne daß es möglich war, deren Zahl irgendwie auch nur der Größenordnung nach festzulegen. Dieselbe Schwierigkeit erwuchs noch in verstärktem Maße bei den Eiweißkörpern, verstärkt deswegen, weil es sich hier nicht um Ketten gleicher Bausteine zu handeln schien, sondern um eine Struktur, die lange Ketten der verschiedenartigsten Aminosäuren in Polypeptidbindung darstellt.

Es haben sich in der Tat in den letzten Jahren viele Forscher mit diesen Problemen beschäftigt. Es ist gelungen, diese ursprünglich rein strukturtheoretische Vorstellung mit neuem Geiste zu erfüllen und die in ihr liegenden Schwierigkeiten, zunächst an Modellen einfacherer Art, zu überwinden. So hat STAUDINGER **6, 7)** an hochmolekularen Stoffen anderer Art, insbesondere an Hochpolymeren einfachster monomolekularer Verbindungen (z. B. des Formaldehyds) gearbeitet und ist zu der Überzeugung gelangt, daß diese reine Strukturmoleküle sind, von zahlenmäßig begrenzter und definirter Ausdehnung, und daß alle Übergänge vorhanden sind, bis endlich mit fortschreitender Kettenlänge der kolloide Stoff, das Molekülkolloid erscheint, das ein Makromolekül ist.

STAUDINGER hat dann dieselbe Ansicht auf den Kautschuk übertragen, der ein

---

6) ***H. Staudinger***, (Zusammenfassende Vorträge) Chemie der hochmol. Stoffe etc. Ber. Chem. Ges. **59**, 3019 (1926), **61**, 2427 (1928). — Organ. Chemie und Kolloidchemie. Kolloid-Zs. **53**, 19 (1930). S.A. — 7) ***Ders.***, Chemie der hochmol. Stoffe etc. Zs. ang. Chem., **1929**, 37, 67, 77. S.A.

„Polypren" ist, d. h. eine sehr lange Kette von Isoprenmolekülen. Auf Grund physikochemischer Messungen, insbesondere der Viscosität, kommt er auch zu Schätzungen der Länge solcher Ketten, z. B. für Kautschuk ca. 1500 Isoprene, also ein Molgewicht von ca. 80.000—100.000; die Längenausdehnung ist ca. 600 mμ. Da er ferner diese seine Annahmen auch auf die Polysaccharide und Proteine übertragen hat (8, 9, 10), so ist sie also als für alle hochmolekularen Naturstoffe berechnet zu prüfen. Es stehen also zunächst zwei Fragen zur Diskussion: erstens über die Berechtigung der STAUDINGER'schen Annahme von riesenhaften Kettenmolekülen mit unmittelbar kolloidalen Eigenschaften überhaupt; und zweitens, ob diese als für den Kautschuk als richtig acceptirte Vorstellung auch für Polysaccharide und Proteine vollkommen oder weniger vollkommen gilt, resp. welche Modifikationen nötig sind.

Man kann mit etwas Willkür, um die Diskussion zu erleichtern, die STAUDINGER'sche Hauptanschauung in drei Aussagen zerlegen.

1. Die hochmolekularen Stoffe bilden durch normale Hauptvalenzen (Covalenzen) im strengen Struktursinne zusammengeheftete Ketten der Bausteine, die so lang sind, daß die Stoffe eben dadurch zu Kolloiden werden (Polymerisation).

2. Andere Bindungsformen, also übermolekulare Kräfte (VAN DER WAALSsche Kräfte, Associationskräfte, Molekularvalenzen) sind zur Erklärung der Erscheinungen, auch des kolloiden Zustandes an sich, nicht notwendig; koordinative Covalenzen (Association) sind nur zur Deutung gewisser nicht principieller Erscheinungen des kolloiden Zustandes notwendig.

3. Diese langen Ketten sind als Moleküle, Makromoleküle, zu bezeichnen.

An sich ist es durchaus nicht notwendig, daß sich der kolloide Zustand auf langen Hauptvalenzketten aufbaut. Er kann sich auch bei ganz einfachen Molekülen ausbilden. So nahm man denn zunächst für die Biokolloide „Grundkörper" an, die zwar schon Ketten sind, aber nicht von genügender Länge, um direkt als die hochmolekularen Kolloide aufzutreten. Sie werden erst dazu, weil sich an ihnen Kräfte von besonderer Art zeigen, die zum sekundären Zusammenschluß, zur Association dieser Grundkörper und somit schließlich zur Ausbildung des kolloiden Teilchens, des Micells, führen. Hierbei ist entscheidend, daß die Ausbildung der Teilchengröße nur von den Associationskräften einerseits, ihnen widerstehenden, zerteilenden Kräften andererseits abhängt, nicht aber einzig und allein von inneren Eigenschaften eines Moleküls. Es kann also dasselbe chemische Gebilde je nach den Umständen in kleineren oder relativ riesengroßen Micellen auftreten, wie dies ja tatsächlich dem Wesen des kolloiden Zustandes einfacherer Stoffe entspricht.

Versucht man dann, aus den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Stoffe wie üblich ein „Molekulargewicht" zu bestimmen, so erhält man enorm große und wechselnde Werte. Nach dem Vorgange von SAMEC bezeichnet man das relative Gewicht dieser Micelle als „Molatgewicht" (H.W. *l. c. 65*). Während z. B. das normale Molgewicht der Proteine nach SVEDBERG 11) ca. 35000 beträgt, findet man bei einigen Vielfache davon, bis über 1 Million. Ähnlich ist es bei Stärke.

---

8) ***H. Staudinger,*** Aufbau der hochmol. Verbind. Naturwiss., **1934,** 65. — 9) ***Ders.,*** Chemie der Cellulose. Naturwiss., **1934,** 797. — 10) ***Ders. c.s.,*** neuere für uns wichtigste Einzelarbeiten: Hochpolymere Verbindungen. Ber. Chem. Ges. (Cellulose), **63,** 2308, 2317, 2331, 3132. S.A., **64,** 1688, **66,** 76 (1930/3). Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **501,** 162 (1933); weitere im folg. citirt. — 11) ***The Svedberg,*** letzte Zusammenfassungen: Ultrazentrifuge etc. Ber. Chem. Ges., **67,** A, 117 (1934), ferner Naturwiss., **1934,** 225.

Es fragte sich nun, welcher Art in den hier interessirenden Fällen die kleinsten, noch chemisch als Strukturgebilde mit einheitlichen Hauptvalenzen, als einheitliche Moleküle zu definirenden Grundkörper sein konnten.

Die Röntgenanalyse der Cellulose, die das erste und heute noch wichtigste Material für diese Art der Untersuchungen darstellt, ergab zunächst einmal, daß dieser Stoff aus Kristalliten besteht, und ferner, daß die Elementarkörper dieser Kristalle kleine Einheiten sein müssen, nicht mehr als vier Zuckergruppen umfassend. Dieser Befund will aber in diesem Fall für die Abgrenzung der Moleküle schon prinzipiell nichts besagen; in solchen Kristallen wie bei der Cellulose — Kettenbausteine in einer sich beliebig oft periodisch wiederholenden Schraubenachse — verliert der kristallographische Molekülbegriff seine Bedeutung und sagt über die Abmessung der kleinsten Teilchen nichts aus (s. u.).

Immerhin lag es bei diesem Befund (Identitätsperiode von 2 C_6-Gruppen) zunächst nahe zu folgern, daß auch chemisch die Cellulose aus kleinen chemischen Grundkörpern besteht; und daß diese durch Kräfte besonderer Art erst zum kolloiden Micell verbunden sind. Mit anderen Worten, man hätte sich dann den Sachverhalt in einfachster Form so darzustellen, daß in sich geschlossene Moleküle von Anhydrozuckern (Hexosanen) der Formel $C_6H_{10}O_5$ (oder allenfalls $C_{12}H_{20}O_{10}$) durch associative Kräfte weiter gebunden sind. Was Kolloide anlangt, so kennen wir solche Kräfte z. B. bei Seifenlösungen, bei denen die an sich einfachen Moleküle von fettsaurem Natrium durch intermolekulare Kräfte zu kolloiden Aggregaten vereinigt sind; diese Stoffe sind auch nach STAUDINGER's Ansicht „Associationskolloide"; aber dieser Fall liegt insofern anders, als es sich hier nicht um reine Moleküle, d. h. mehr oder weniger vollkommen homoiopolare Stoffe, handelt, sondern um z. T. elektrolytisch dissociirte Stoffe. Hier spielen also elektrostatische Anziehungen zwischen Ionen mit. Bei nicht (bzw. kaum) dissociirten Stoffen kennen wir zwar zweifellos auch Associationen, aber quantitativ ganz anderer Art. Hier handelt es sich entweder um Flüssigkeiten, die z. T. in doppelter oder vierfacher Molekulargröße auftreten, wie etwa Wasser H_4O_2 oder Essigsäure, auch Alkohole, oder um Molekularverbindungen in festem Zustande. Diese erreichen aber niemals Associationsgrößen von solcher Höhe, wie wir sie etwa in dem Celluloseaggregat annehmen müssen. Es ist auch von vornherein abwegig, etwa anzunehmen, daß in der Cellulose nun — wie es die Formel $(C_6H_{10}O_5)^x$ verlangt — eines der bekannten, frei darstellbaren Glucosane (Anhydrid der Glucose) $C_6H_{10}O_5$ oder ein Cellobiosan (Anhydrid der Cellobiose), $C_{12}H_{20}O_{10}$, vorhanden ist, ebensowenig in der Stärke das Trihexosan resp. Dihexosan. Diese Stoffe haben zwar natürlich in festem Zustande eine Kristallstruktur aus Molekülgittern, aber sie sind in Wasser echt löslich, d. h. diese Gitterkräfte werden von den zerteilenden Kräften des Wassers überwunden. Sie sind also in Wasser in einzelnen Molekülen verteilt, sie associiren nicht. Solche Stoffe können nicht in dem Kristallgitter der Cellulose vorhanden sein, genau so wenig, wie in den Polyoxymethylenen $(H_2CO)^x$ STAUDINGER's das normale Molekül des Formaldehyds HCHO.

Will man also an den kleinen Grundkörpern festhalten, so muß man annehmen, daß hier in den Gitterpunkten Stoffe von etwas abweichender Struktur sitzen, bei denen associative Kräfte besonderer, verstärkter Art auftreten, die so stark sind, daß Wasser das Aggregat nicht mehr zerteilt. Solche Bausteine hat man tatsächlich angenommen, und dabei an Zuckeranhydride mit abweichenden Strukturen gedacht, die in wässeriger Lösung nicht existenzfähig sind, sondern sofort wieder associiren. Man glaubte solche einfachen Bausteine durch nicht wässerige Aufspaltung nachweisen zu können. Man nahm an, daß durch nicht hydrolysirende Zerlegung der Molate, etwa unter dem Einfluß des Erhitzens mit wasserfreiem Glycerol, oder durch Eindringen von Acetylgruppen in die Einzelgruppen, die associativen Bindungen so geschwächt werden, daß nunmehr molekulare Dispersion durch das Lösungsmittel

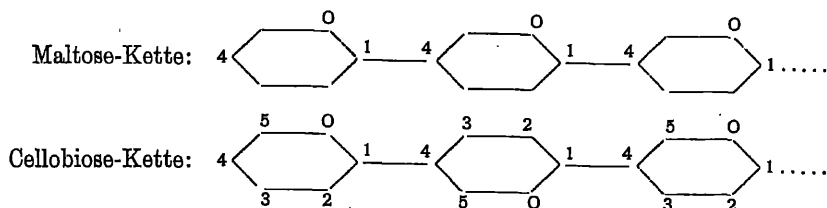
erfolgt. Man glaubte mit physiko-chemischen Messungen, wie der Kryoskopie, niedrige Molgewichte direkt festlegen zu können; man schloß ferner auf die Aufhebung nicht von Covalenzen, sondern von Valenzen höherer Ordnung aus dem Unverändert-bleiben der optischen Aktivität (PRINGSHEIM 12)) und ähnlichen Befunden.

Dies ist ungefähr die Sachlage, wie ich sie im Lehrbuch der Enzyme 1927 geschildert habe (S. 291 ff.). Man findet weitere Belege dafür in den zusammenfassenden Arbeiten von BERGMANN 13—15), PRINGSHEIM 16) und K. HESS 17). Letzterer nahm in dieser Hinsicht die äußerste Flügelstellung insofern ein, als er zuerst als Grundkörper der Cellulose nicht einmal die Cellobiose anerkannte, sondern annahm. daß die Cellulose ausschließlich aus einem Anhydrid der Glucose selbst aufgebaut sei. Später hat er (18) ebenfalls einen anhydrischen Doppelzucker angenommen.

§ 364a. **Die hochmolekularen Stoffe sind lange Ketten.** Es ist für unsere Zwecke nicht mehr notwendig, die Einzelheiten dieser Umwälzung in den Grundanschauungen wiederzugeben, wenigstens nicht hier in der allgemeinen Einführung, denn auf manche Dinge kommen wir ohnehin noch zurück, wenn wir auf Einzelheiten eingehen müssen. Denn diese Bewegung von der klassischen Strukturlehre weg ist bald wieder zusammengebrochen. Es hat sich schnell erwiesen, daß weder ihre theoretischen noch ihre experimentellen Stützen ausgereicht haben, um ein tragfähiges neues Gebäude zu schaffen. Daß die scheinbar stärksten Stützen, die Röntgendiagramme, auch schon rein theoretisch wegfielen, weil sie garnichts für kleine oder große Grundkörper aussagen können, haben wir bereits vermerkt; im Gegenteil erwies sich dies Instrument in den Händen von K. H. MEYER u. MARK als wesentlich für die Begründung der Lehre von Kettenstrukturen. Bei anderen Hochpolymeren, seinen Poly-oxy-methylenen, wies STAUDINGER 19) direkt nach, daß Kristalle aus langen Kettenmolekülen kleine Elementarkörper besitzen können. Dann zeigten MEYER u. MARK 20) (weitere Originallit. in ihrem Buch, l. c. 2) durch Röntgendiagramme unter Benutzung des Prinzips der Raumerfüllung auf grund der bekannten Atom-abstände —C—C— und C—O—, daß die Cellulose aus Ketten von Cellobiose besteht, und zwar Ketten mit einer digonalen Schraubenachse; entlang der Faserachse kehrt immer nach 2 Glucosegruppen Identität wieder, nach je 10,3 Å. Zu grundsätzlich denselben Ergebnissen kamen HERZOG 21) und HAWORTH 22). Für die Stärke kann man den gleichen Bau nur mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen. Denn direkt den Bau aufklärende Röntgendiagramme sind hier bisher nicht aufzustellen, man muß sich also in der Hauptsache mit rein chemischen Argumenten begnügen, worauf

---

12) ***H. Pringsheim, J. Leibowitz,*** Bez. zw. opt. Dreh. und Struktur etc. Ber. Chem. Ges., **58**, 2808 (1925). — 13) ***M. Bergmann,*** Hochmol. Zustand von Kohlehydr. etc. Zs. ang. Chem., **38**, 114 (1925). — 14) ***Ders.,*** Allg. Strukturchemie der kompl. KH etc. (Vortrag). Ber. Chem. Ges., **59**, 2973 (1926). — 15) ***Ders.,*** Strukturproblem der assoc. Lactolide etc. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **452**, 121 (1927). — 16) ***H. Pringsheim,*** Abbau und Aufbau der Polysacch. (Vortrag). Ber. Chem. Ges., **59**, 3008 (1926). — 17) ***K. Hess,*** Chemie der Cellulose. Leipzig 1928, ferner Naturwiss., **1934**, 469. — 18) ***K. Hess, M. Ulmann,*** Molgew. der krist. Acetylcellul. Ber. Chem. Ges., **67**, 2131, **68**, 134 (1935). — 19) ***H. Staudinger c. s.,*** Polymerer Formaldehyd, Modell der Zellulose. Zs. physikal. Chem., **126**, 425 (1927); s. a. Helv. Chim. Acta, **11**, 1047, 1052 (1928). — 20) ***H. Mark,*** Röntgen. Ermittl. der Struktur .... hochmol. Subst. (Vortrag). Ber. Chem. Ges., **59**, 2982 (1926). — 21) ***R. O. Herzog, W. Jancke,*** Röntgendiagramm der Zellulose. Zs. physikal. Chem., A **139**, 235 (1928). — 22) ***W. N. Haworth,*** Structure of carboh. Helv. Chim. Acta, **11**, 534 (1928).

wir § 366 eingehen werden. Aber gesichert ist für beide Arten von Polyosen, daß ihnen Biose-Ketten zugrunde liegen, die Glykosid-Bindungen in 1,4 haben, also aus Cellobiose resp. Maltose bestehen. Diese Bindung entspricht in der Projektion einer Para-Bindung an einem Benzolkern, hier also einem Pyran-kern der Zucker, und läßt somit die Ausbildung langer Ketten besonders einfach erscheinen, wenn man von der räumlichen Lagerung zunächst absieht. Dies ergibt sich aus folgendem Schema:

Neben diesen mehr kristallographischen Begründungen liefen aber andere Untersuchungen, die nun auch die anderen Stützen der Lehre von den kleinen Grundkörpern systematisch wegbrachen.

Die scheinbar so schlagenden kryoskopischen Molgewichtsbestimmungen an ohne Hydrolyse in Lösung gebrachten Polyosen, die erweisen sollten, daß z. B. in der Acetylcellulose ein monomeres Acetyl-glucosan oder ein Acetyl-biosan vorliegt, haben methodisch in eine Sackgasse geführt; man kann auch heute noch nicht sagen, ob solche Zahlenangaben irgendwie verwertbar sind. Freudenberg 23) hält die Methode für gänzlich unzuverlässig, und Hess 24), der sich vor allem mit ihr beschäftigt hat, ist seiner Sache nicht mehr sicher. Pringsheim (l. c. 3, S. 351) hält auch grade für Cellulose die Methode für unzulänglich, weil man hier mit so großen Verdünnungen arbeiten muß, daß man an die Fehlergrenzen herankommt; dagegen will er sie unter bestimmten Bedingungen für andere Objekte zulassen, so für Acetate der Amylose, des Inulins, des Mannans, s. a. § 371.

Weiter zeigte sich in gewissen Fällen, daß die Eigenschaften mancher Derivate nicht mit der Annahme kleiner Grundkörper in Einklang zu bringen sind. Nur ein Beispiel sei erwähnt. Nach Freudenberg 25) hat die Anhydro-trimethyl-glucose, die also strukturchemisch identisch sein sollte mit der methylirten Cellulose selbst, mit dieser garkeine Ähnlichkeit. Nach Freudenberg 26) läßt sich auch nach den Ergebnissen der Acetolyse von Cellulose ausschließen, daß Cellulose aus einem Cellobiosan nur durch Association aufgebaut ist. Denn dann müßte diese Zerlegung 100% Cellobiose ergeben, während in Wirklichkeit nicht viel mehr als 30% Cellobiose entstehen, weil eben auch die Innenbindungen aufgesprengt werden.

Endlich sei erwähnt, daß nach K. H. Meyer 27) auch aus den Berechnungen der Molkohäsion sich erschließen läßt, daß eine Art „Isomerie" zwischen Cellulose und einem Glucosan oder Biosan unmöglich ist. Die Molkohäsion als das Maß der zusammenhaltenden Kräfte eines homoiopolar gebundenen organischen Stoffes zuzüglich gewisser Inkremente für polar gebundene Gruppen drückt sich aus in Löslichkeit und Flüchtigkeit (Verdampfungswärme); diese Größen sind in erster Annäherung additiv, hängen also in der Hauptsache von der Molgröße ab; die Molkohäsion ist also für wahre Isomere der Größenordnung nach gleich groß. Berechnen ließ sich aber für Glucose etwa 24000, für Cellobiose 60000, dagegen für Cellulose 1.200.000 (nach l. c. 3).

---

23) ***K. Freudenberg* c. s.**, Cellotriosan und Cellulose. Ber. Chem. Ges., **62**, 3078, **63**, 535 (1930). — 24) ***K. Hess***, Mol. Gew. Bestimm. in Eisessig. Ber. Chem. Ges., **63**, 518 (1930); dagegen ***E. Garthe, K. Hess***, Mol. Gew. Bestimm. in Eisessig. ebd. **64**, 882 (1931). — 25) ***K. Freudenberg, E. Braun***, Methylcellulose. Ann. Chem. Pharm. (Liebig), **460**, 288 (1928). — 26) ***K. Freudenberg* c. s.**, Methyl-cellotriose etc. Ber. Chem. Ges., **63**, 1961 (1930). — 27) ***K. H. Meyer***, Chemie der Micelle etc. Biochem. Zs., **208**, 1 (1929).

Diese Erwägungen wurden weiterhin gestützt durch rein chemische Befunde. FREUDENBERG 25) und HAWORTH 28) gelangten zu einer völlig methylirten Cellulose, die dann bei der Hydrolyse eine — mit Ausnahme der Endgruppen — einheitliche 2-, 3-, 6-Trimethyl-glucose lieferte; es sind also alle Bindungen 1, 4-Bindungen, mithin Cellobiose. Dasselbe gelingt mit Stärke (29, 30)) und Inulin (31)). Und endlich lieferte der vorsichtige Abbau der Cellulose (32 bis 35)) wie der Stärke (36)) höhere Oligosen als die Biosen, nämlich Cello-triose, Cello-tetraose, Cello-hexaose und Amylo-hexaose. Noch höhere Einheiten lassen sich aus Stärkedextrinen isoliren: das kristallisirte Erythro-dextrin KÖHLER-HOLLANDER's 37) hat 18 Glucosen; daneben ist wahrscheinlich noch ein 12-Dextrin vorhanden, die zusammen kristallisiren und wahrscheinlich auch noch „Stärke" mit 24 Glucosen einschließen.

Wir können hier darauf verzichten, auf diese Diskussionen näher einzugehen, denn es ist in einer principiellen Frage heute eine fast uneingeschränkte Verständigung erzielt. Die Theorie der ganz kleinen Bausteine mit Association zum Kolloid kann als abgetan gelten. Es herrscht fast Einhelligkeit darüber, daß in allen Polyosen sich hauptvalenzmäßig gebundene Ketten von erheblicher Länge vorfinden. Der Abbau ist also gleichbedeutend mit einer Verkürzung dieser Ketten durch Lösung der Hauptvalenzbindung, also hier der glykosidischen —O—Bindung zwischen zwei Zuckern. Das kann in beschränktem Umfange geschehen, dann erhält man Gebilde mit zwar schon relativ kurzen, aber noch die Trisaccharidstufe überschreitenden Ketten; dies sind die Dextrine, der Stärke wie der Cellulose, die damit endlich ohne principielle Schwierigkeiten in das System eingegliedert werden können; je nach ihrer Molgröße können sie noch Andeutungen kolloidaler Eigenschaften zeigen oder nicht mehr. Mit den noch rein darzustellenden Gebilden aus 6 Zuckergruppen, Cellohexaose und Amylohexaose, nähern wir uns den Oligosen, zu denen dann die schon zuckerartigen Stoffe Cellotriose und Cellotetraose endgiltig überleiten, auch enzymtypisch. Denn die beiden letzteren und die Cellohexaose sind noch durch Cellobiase spaltbar, die letztere aber auch schon von Cellulase, dem auf die Polyose eingestellten Specialenzym (GRASSMANN); Amylohexaose wird von Maltase nicht mehr gespalten, nur noch von den Amylasen (WALDSCHMIDT-LEITZ). Jedenfalls ist nun also der ganze Aufbau von der Glucose selbst zu den hochpolymeren Polyosen im Princip völlig durchsichtig.

Nehmen wir auch hier die am besten untersuchte Cellulose, so ist es also erwiesen, daß sie aufgebaut ist aus lauter Cellobiose-resten in gleichförmiger β-glucosidischer Bindung; und da die β-Bindung es bedingt, daß die zweite Glucose jeweilig gegen die erste um die Faserachse gedreht ist (s. Formel § 334), so ist eben das ganze Cellulose-Molekül um diese digonale Schraubenachse orientirt. Daß alle Bindungen in diesen langen Ketten identisch sind, ist auf grund kinetischer Messungen bei der Hydrolyse (Freiwerden von Carbonyl-gruppen im Verhältnis zur Zeit) von FREUDENBERG u. W. KUHN 38) mit besonderer Methodik nachgewiesen worden. In der Cellulose gibt es

---

28) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, H. A. Thomas,*** Trimethylcellulose. Jl. of Chem. Soc., **1931,** 821. — 29) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, J. I. Webb,*** Acetyl. and methyl. of starch. Jl. of Chem. Soc., **1928,** 2681. — 30) ***Dies.,*** Glycogen. ebd., **1929,** 2479. — 31) ***W. N. Haworth, A. Learner,*** Struct. of inulin. ebd., **1928,** 619. — 32) ***R. Willstätter, L. Zechmeister,*** Hydrol. von Cellulose. Ber. Chem. Ges., **62,** 722 (1929). — 33) ***L. Zechmeister, G. Tóth,*** Hydrol. von Zellulose. Ber. Chem. Ges., **64,** 854 (1931). — 34) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst,*** Cellotriose. Jl. of Chem. Soc., **1931,** 824. — 35) ***K. Freudenberg c. s.,*** Cellulose und Stärke. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **494,** 41 (1932). — 36) ***E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel,*** Kristall. Hexaose aus Stärke. Zs. phys. Chem., **223,** 76 (1934). S.A. — 37) ***L. Köhler-Hollander,*** Kristallis. Erythrodextrin. Zs. phys. Chem., **228,** 249 (1934). — 38) ***K. Freudenberg, W. Kuhn c. s.,*** Hydrolyse der Polysaccharide etc. Ber. Chem. Ges., **63,** 1510 (1930), **65,** 484 (1932).

also keine andere Bindung als die normale β-glykosidische; s. a. **39)**. Bei der Stärke liegt die Sache nicht so klar; FREUDENBERG hält es zwar für einigermaßen sicher, daß es hier ebenso liegt, aber der ganze Aufbau der Stärke enthält ja noch grundsätzliche Unklarheiten, auf die wir § 365 zurückkommen. Ganz analoge Ergebnisse liefern für die Cellulose Berechnungen aus der optischen Drehung (**35)**): von der Cellobiose über die höheren Oligosen bis zur Cellulose selbst liegen die Drehwerte auf einer Graden und lassen somit auf eine einheitliche Bindung schließen. (Kritik an der Methodik KLAGES **40)**).

Enzymtypisch betrachtet, können wir aus dieser Erkenntnis mit Sicherheit schließen, daß der beginnende Abbau der kolloiden Substrate nicht darauf beruht, daß erst primär eine besondere Fermentgruppe die irgendwie zu definirenden intermolekularen Bindungen zwischen diesen Ketten löst, eine primäre Des-aggregation katalysirt. Es geht der Abbau vielmehr zweifellos derart vor sich, daß gleich von Anfang an Glykosidbindungen gelöst, die Ketten — vielleicht von beiden Enden her — verkürzt werden; damit geht eine Abnahme der intermolekularen Bindungskräfte ganz von selbst vor sich, und so finden wir den allmählichen Übergang bei der enzymatischen Hydrolyse vom voll kolloiden über den halbkolloiden Zustand bis zu den nicht mehr kolloiden Oligosen, bei denen die intermolekularen Kräfte nur noch die übliche Größenordnung haben, wie sie einerseits für Kristalle, andererseits für die Beziehungen zum Lösungsmittel gegeben sind. Desaggregirende Enzyme scheint es bei den Polyosen ebensowenig zu geben wie bei den Proteinen.

Länge der Ketten. Aus diesem Grunde ist für unser Fermentwerk auch die an sich überaus wichtige Frage nicht von principieller Bedeutung, wie lang diese Ketten sind. Hier liegt noch eine unausgeglichene Differenz vor zwischen STAUDINGER und MEYER-MARK. Mit der Kettenlänge sind automatisch zwei weittragende Probleme verbunden: einerseits die Frage, ob sie ausreicht, um an sich ein Vollkolloid zu formiren (Molekülkolloid nach STAUDINGER), oder ob die Ketten ihrerseits doch noch durch intermolekulare Kräfte zum Vollkolloid erst geformt werden. Andererseits die an die Grundprobleme der Chemie rührende Fragestellung, ob diese langen Ketten „Moleküle" sind, Makro-Moleküle nach STAUDINGER, oder ob man sie anders definiren und somit anders bezeichnen soll. Um unseren Überblick abzurunden, sei ganz kurz angegeben, um was es sich handelt.

Auch hier dreht sich die Diskussion hauptsächlich um den Bau der Cellulose. Bei den anderen Polyosen liegen die Verhältnisse entweder so gut wie sicher etwas anders, so beim Inulin, oder der Aufbau ist noch in anderen Hauptpunkten unklar wie bei der Stärke. Für die Cellulose also nimmt STAUDINGER ein riesenhaftes echtes Molekül an, eine ununterbrochene gleichförmige Kette von Cellobiose-resten in glykosidischer Hauptvalenz-bindung. Diese Kette muß demnach so lang sein, daß sie in Dimensionen hineinwächst, die ausreichen, um einerseits die Eigenschaften eines Voll-kolloids, andererseits die Faser-eigenschaften zu erklären. STAUDINGER **41, 42)** nimmt dafür an eine Kettenlänge von im Durchschnitt 750 Glucosen mit einer Er-

---

39) ***K. H. Meyer, H. Mark c. s.,*** Bemerk. zu FREUDENBERG etc. (Polysacch.). Ber. Chem. Ges., **63,** 1531 (1930). — 40) ***F. Klages,*** Hydrol. der Polysacch. Ber. Chem. Ges., **65,** 302 (1932). — 41) ***H. Staudinger, O. Schweitzer,*** Mol. Größe der Cellulose. Ber. Chem. Ges., **63,** 3132 (1930). S.A. — 42) ***H. Staudinger, H. Freudenberger,*** Konstit. der Cellulose. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **501,** 162 (1933).

streckung über 3700 Å; dies würde also einem Molgewicht von 120000 entsprechen. Es kommen aber auch längere Ketten vor, so bei Baumwolle von bis 1200 Glucosen mit einer Länge von 5000 Å und einem Molgewicht von 190.000. Diese hohen Werte gelten nur für genuine Cellulosen; alle irgendwie vorbehandelten sind bereits abgebaut, sie zeigen Kettenlängen von 150 bis 500 Gliedern. Abgebaut sind auch schon die von HAWORTH untersuchten Acetyl-cellulosen (s. u.).

KRAEMER c. s. **42a)** kommen auf grund von Messungen mit der Ultra-zentrifuge sogar zu Werten von 300.000, und ebenso kommt CLARK **42b)** aus mikroskopischen Beobachtungen zur Annahme noch größerer Molgewichte als STAUDINGER. Näh. s. § 413.

Für die Stärke mit ihrem möglicherweise viel verwickelterem Aufbau sind diese Ergebnisse an der Cellulose an sich nicht maßgebend, auch STAUDINGER fällt hier noch keine endgiltige Entscheidung; FREUDENBERG **42c)** hält für die Stärke eine Kettenbildung von ziemlich erheblicher Länge für wahrscheinlich. Die Dinge liegen hier schon deswegen anders, weil wir bei der Stärke noch nicht einmal über den Beweis einer Faserstruktur verfügen, da die Röntgendiagramme dafür nicht ausreichen. Hier können wir also noch garnicht aussagen, was mehr ins Gewicht fällt, die mehr physikalischen Messungen der Kettenlängen an sich oder die chemischen Argumente gegen die STAUDINGER'schen Annahmen, auf die wir nunmehr einen Blick werfen müssen. Es ist durchaus möglich, daß STAUDINGER für die Cellulose Recht behält, während für die Stärke die rein chemischen Argumente der Schule HAWORTH den Entscheid geben, daß die Stärke kurzgliedrig ist (etwa 24 Glucosen), und die hohen gefundenen Molatgewichte eben Micell-gewichte sind.

Denn auch bei der Cellulose ist STAUDINGER's Theorie nicht unbestritten. Seiner Annahme reiner Covalenzketten bis zur Ausbildung des vollkolloiden Zustandes haben K. H. MEYER u. H. MARK eine andere Theorie gegenübergestellt. Sie nehmen relativ kurze Ketten an, 60—100 Glucosen, die also auch schon recht „hochmolekular" und sozusagen kolloid sind, die aber zum vollen Kolloid erst dadurch werden, daß dann doch noch eine intermolekulare Association durch VAN DER WAALS'sche Kräfte, also Nebenvalenzbindungen im weitesten Sinne des Wortes, hinzutritt.

Zu diesem Problem haben K. H. MEYER und H. MARK **43—45)** durch Hereinziehung eines neuen meßbaren Faktors einen sehr wesentlichen Beitrag geliefert. Die Autoren gehen davon aus, daß wir bei den Kohlenstoffverbindungen der aliphatischen Reihe die Atomabstände, —C—C—, —C—H usw., bei den normalen Bindungen exakt kennen, sie betragen 1,0—1,6 Å oder 0,1—0,16 mμ ($m\mu = 1 \times 10^{-6}$ mm). Es müssen also alle (nach dem gleichen Typus gebauten) Verbindungen in ihren Hauptvalenzen diesen Abstand zwischen den C-Atomen aufweisen, während die Molekularverbindungen jeden anderen Abstand von mehr als 0,16 mμ zulassen. MEYER und MARK haben nun mit präziser Methodik den Kristallbau der Cellulose gemessen und geben ihr folgendes Bild. Sie besteht aus Cellobioseketten, die durch Hauptvalenzen geflochten sind, und zwar in einer Ausdehnung von 50—100 Glucosen. Aber diese Ketten sind noch nicht das kolloide Micell, sie sind vielmehr frei nicht beständig, sondern sind ihrerseits noch

---

42a) ***E. O. Kraemer, W. D. Lansing,*** Mol. weights of cellulose. Nature **1934,** I, 870; Jl. of physic. Chem., **39,** 153 (1935); BPh **87,** 237. — 42b) ***G. L. Clark,*** Macromolecule and micelle as structural units etc. Cold Spring Harbour Sympos. quant. Biol., **2,** 28 (1934); BPh **85,** 456. — 42c) ***K. Freudenberg,*** Kinet. of long chain disint. appl. to cellul. and starch. Faraday Soc. Sept. 1935. — 43) ***K. H. Meyer,*** Chemie der Micelle etc. Bioch. Zs. **208,** 1 (1929). — 44) ***K. H. Meyer, H. Mark,*** Bau des kristallis. Anteils der Cellulose. Ber. Chem. Ges., **61,** 593, 2432 (1928), **64,** 1999 (1931). — 45) ***H. Mark, K. H. Meyer,*** Cellulose II. Zs. Physikal. Chem., B **2,** 115 (1929).

wieder durch VAN DER WAALS'sche Kräfte zwischen den Ketten in wesentlich größerem Abstand gebunden, zum Kristalliten, zum Micell, associirt. Die Cellulose besteht aus Bündeln solcher Ketten, und zwar bilden 40—60 Ketten gebündelt ein Micell. HAWORTH **46, 47)** kommt zu ganz ähnlichen Ergebnissen. Er findet mit einer rein chemischen Methode, nämlich Auszählung der freien Endglieder (CH_2OH-Gruppen*)) eine Kettenlänge bei Cellulose von 100—200 × C_6. Cellulose hätte demnach ein wahres Molgewicht von ca. 30.000, was den mit vielen anderen Methoden ermittelten Werten nahe kommt, ebenso aber auch dem SVEDBERG'schen Wert für das wahre Molgewicht der Proteine, ca. 35.000.

Mit einer ganz anderen Methode und einer gradezu erstaunlichen Genauigkeit hat SCHMIDT **48, 48a)** die Kettenlänge aller genuinen Cellulosen zu 96 Gliedern bestimmt.

Er fand, daß zunächst die von ihm aus Laubholz durch NaOH isolirte Cellulose neben Methoxylen auch Carboxyle — wahrscheinlich in Form von Lactonen an endständigen Aldonsäuren — enthält, die man durch konduktometrische Titration sehr genau bestimmen kann. Auf COOH berechnet fanden sich dort 0,28% Carboxyl. Um auszuschließen, daß diese erst durch die Vorbehandlung entstanden sind, untersuchte er weiter die verschiedensten genuinen Cell. und fand überall denselben Wert mit ganz minimalen Schwankungen, z. B. in Baumwolle, B-Cellulose, Tunicin. Dieser Wert ist also nach SCHMIDT völlig charakteristisch für genuine C. Schaltet man die seltenen größeren Streuungen aus, so ergibt sich für die Kettenlänge ein Wert von 94—96 Gliedern. 95 scheidet wegen der Cellobiosestruktur aus, 94 wegen des offensichtlichen Verhältnisses zum Xylan mit 32 Gliedern. Es ergibt sich also genau 96.

Mit der C. ist im Laubholz ständig ein Xylan verbunden (als Acetylxylan) im Verhältnis 1 : 3 Cellulose. Dieses hat genau 32 Kettenglieder, ebenfalls aus dem Carboxyl berechnet. Nach FREUDENBERG **49)** kann die Berechnung von SCHMIDT nicht stimmen, das Carboxyl nicht endständig sein; man müßte sonst das stets vergeblich gesuchte Trimethyl-glucolacton auffinden können. Für das Mannan aus Steinnuß kam KLAGES **50)** zu einer Kettenlänge von 70—80 Gliedern einer Mannopyranose in 1, 4-Bindung genau wie in der Cellulose, anscheinend α- und β-Bindung gemischt; Mannan B ist höher polymer als A.

Dagegen werden für alle Stärkearten sehr viel kürzere Ketten angegeben, und zwar übereinstimmend von etwa 24—30 Glucosen. PICTET **51)** kam durch eine Extrapolation der Drehwertkurven an seinen verschiedenen Hexosanen (§ 371) zu einer Kettenlänge von ca. 18 (Molgew. 2916). Da aber das kristallisirte Erythrodextrin von KÖHLER **52)** bereits 18 Glieder enthält, so ist dieser Wert sicher etwas zu klein. Aber in der Größenordnung stimmt er mit den rein chemischen Bestimmungen der Endglieder als Tetramethylglucose der Schule HAWORTH **53, 54, 55)** überein. HIRST c.s. **54)** nimmt

*) Die Endgruppen mit freiem CH_2OH ergeben bei der Methylirung Tetramethylglucose, die Mittelglieder Trimethyl-glucose; aus dem Verhältnis dieser beiden Derivate kann man die Kettenlänge berechnen,

46) ***W. N. Haworth,*** Konstitution der KH. 1929, dtsch. von W. E. HAGENBUCH, Dresden 1932, S. 86. — 47) ***W. N. Haworth, H. Machemer,*** Mol. Struct. of cellulose. Jl. of Chem. Soc., **1932,** 2270. — 48) ***E. Schmidt c. s.,*** Kettenlänge der Cellulosen etc. Cell. Chem., **13,** 129 (1932). — 48a) ***Ders. c. s.,*** Quantit. Best. der Carboxylgruppen von Cellulose etc. Ber. Chem. Ges., **67,** 2037 (1934). — 49) ***K. Freudenberg,*** Chemie der Stärke etc. (Vortrag). Ang. Chemie, **1934,** 675. S.A. — 50) ***F. Klages,*** Konstitution von Mannan. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **509,** 159 (1933), **512,** 185 (1934). — 51) ***A. Pictet,*** Poids moléc. de l'amidon. Helv. Chim. Acta, **9,** 33 (1926). — 52) ***L. Köhler-Hollander,*** Krist. Erythrodextrin. Zs. phys. Chem., **228,** 249 (1934). — 53) ***W. N. Haworth, E. G. V. Percival,*** Mol. Struct. of glycogen. Jl. of Chem. Soc., **1932,** 2277. — 54) ***E. L. Hirst, M. M. T. Plant,*** Mol. Struct. of amylose etc. Jl. of Chem. Soc., **1932,** 2375. — 55) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, M. D. Woolgar,*** Mol. Struct. of waxy maize starch. ebd., **1935,** 177.

für Amylo-amylose als wahrscheinlichsten Wert 24 an. Derselbe Wert gilt aber für alle Erscheinungsformen der pflanzlichen Stärke, auch Amylopectin etc., die sich nach HIRST nicht durch die chemische Struktur, sondern nur durch die Verschränkung der Ketten unterscheiden. Auch die mit Jod rotfärbende Stärke, z. B. aus Wachsmais, ergibt denselben Wert (HAWORTH c. s. 55)).

Glykogen hat nach HAWORTH 53) eine noch kürzere Kette, nicht viel über 12. Aber das bezieht sich naturgemäß nur auf das präparativ erhaltene Gl. und erlaubt keine direkten Rückschlüsse auf das Gl. in der Zelle selbst. Einerseits ist ja die Methode der Gewinnung von Gl. eine sehr eingreifende, andererseits wissen wir durch WILLSTÄTTER, daß das Gl. in der Zelle zum großen Teil fest gebunden als Desmoglykogen enthalten ist (§ 372a).

Es ist somit für alle Stärkearten sehr wahrscheinlich geworden, was LING, PICTET u. a. von jeher angenommen hatten, da sie in Form von Hexosanen immer zuerst solche mit 6 Glucosen erhalten hatten, daß nämlich eine Sechsergruppe in den Stärkearten irgendwie vorgebildet ist, und sei es auch nur im Sinne von HAWORTH durch räumliche Anordnungen. Denn nunmehr haben wir die sichere Kenntnis, daß beim Abbau zweifellose Körper mit 6 Glucosen entstehen: die Hexaose von WALDSCHMIDT-LEITZ 56), das 18-Dextrin von KÖHLER und ein wahrscheinlich darin noch enthaltenes 12-Dextrin, das mit dem 18-Dextrin zusammen kristallisirt.

Natürlich ist es in allen Fällen noch möglich, daß es sich doch nur um Minimalzahlen handelt, wenn etwa die homogenen Ketten an einer oder mehreren Stellen durch eine andersartige Bindung unterbrochen sind. SCHMIDT hält dies auch für seine Celluloseketten für möglich, was also eine Kompromißlösung zwischen den Ansichten STAUDINGER's und MEYER's resp. HAWORTH' bedeuten würde. Und für die genuine Stärke gibt der neue Befund von WALDSCHMIDT-LEITZ 57) zu denken, daß die wirklich genuine Stärke, d. h. Kleister, gegen die beiden Amylasen resistent ist, und nur durch ein neues, präparativ abtrennbares Enzym zur Stufe der nunmehr durch beide Amylasen angreifbaren Stärke, also etwa zur Amylo-amylose-Stufe abgebaut wird *).

Daß der diastatische Stärke-abbau in verschiedenen „Stufen" verläuft, die sich halbwegs differenziren lassen, ist eine längst bekannte Tatsache, auf die wir schon im H.W. hingewiesen haben, z. B. S. 654, BILTZ (*l. c. 37*). Nun hat BRINTZINGER 58) mit einer neuartigen Methode diese wichtige Frage wieder aufgenommen, indem er die Dialysen-koeffizienten beim diastatischen Abbau gemessen hat. Wenn er dabei sehr schwaches Enzym verwendet, so findet er im Abbau ziemlich einheitliche und längere Zeit stabile Stufen bei Molgewichten von 3700—3800 sowie 600—660, während vor dem Abbau eine Stufe mit ca. 22800 vorhanden ist, die mit starkem Enzym sehr schnell in eine wohl sicher nicht einheitliche Stufe von 800 übergeht. Bei schwachem Enzym (nur 10% des sonst verwendeten) findet eine totale Aufspaltung zu Maltose nicht statt; das Molgewicht des Endgemisches schwankt um 450 herum (Trisaccharid? ?). Die stabile Stufe bei 3800 würde nun wieder tatsächlich einer Kette von 24 Glucosen entsprechen, da 24 mal $C_6H_{10}O_5$ = 24 mal 162 = 3888 ist. Er kommt also auf einem völlig neuen Wege wieder zu der nun schon auf den verschiedensten Wegen angenommenen Kette von 24 Gliedern. Weiter entspricht die anfängliche Stufe von 22800 wieder 6 mal 3700, könnte also auf ein Aggregat von 6 mal 24 Gliedern deuten, sei es nun auf ein Associat von

*) Anm. bei der Rev. In einer soeben in der Zs. phys. Ch. erschienenen Arbeit haben WALDSCHMIDT-LEITZ u. MAYER gezeigt, daß es sich hier um eine „Amylo-phosphatase" handelt (l. c. 70). Wir kommen in den ff. Abschnitten darauf zurück, bes. §§ 372, 379.

56) ***E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel,*** Krist. Hexaose aus Stärke. Zs. phys. Chem., **223**, 76 (1934). S.A. — 57) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Stufenweiser enzym. Abbau der Stärke. Ang. Chemie, **1934,** 557. — 58) ***H. Brintzinger, W. Brintzinger,*** Enzymat. Stärkeabbau etc. Zs. anorg. Chem., **196,** 50 (1931).

6 echten Molekülen oder auf ein langes Molekül mit Unterbrechung der Kette nach je 24 Glucosen. Seine Stufe bei 600 ist allerdings kaum zu deuten, wahrscheinlich handelt es sich hier um undefinirbare Gemische.

Demgegenüber hält STAUDINGER **59—63)** an seiner Ansicht durchaus fest; er versucht mit einem außerordentlichen und bewunderungswürdigen Aufwand von Experimentirkunst die Einwände zu widerlegen und endgiltig beweisendes Material für seine Theorie zu beschaffen. In der letzten Zeit ist für ihn besonders die von ihm ausgebaute Methode der Messung der „Spezifischen Viscosität" in den Vordergrund getreten, und um die theoretische Berechtigung und zahlenmäßige Genauigkeit dieser Meßmethode dreht sich nun hauptsächlich der Streit.

STAUDINGER **63)** hat gezeigt, daß unter gewissen Voraussetzungen auch bei Polymerhomologen die spezifische Viscosität proportional dem Molgewicht ist. Sie wird durch folgende Formel ausgedrückt, in der η_c = gemessene Viscosität, η_0 = Viscos. des reinen Lösungsmittels ist:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_c}{\eta_0} - 1.$$

Diese spezifische Viscosität ist nun nach STAUDINGER $\eta_{sp} = K_m \cdot c \cdot M$ (M = Molgewicht). Die Viscosität ist eine additive Eigenschaft der Baugruppenrümpfe. Sie ist hier eine direkte Funktion der riesenhaft langen Moleküle, die sich nicht wie bei Suspensoiden mit kugelförmigen Teilchen leicht neben einander bewegen können, sondern sich gegenseitig den Weg verstellen. Diese Gleichsetzung hat viel Widerspruch erfahren, jedoch hält ST. an der Korrektheit der nach dieser Methode gewonnenen Molgrößen fest, aus denen sich eben die Riesenketten ergeben. KARRER **64)** erkennt die Berechtigung der Viscosität als Maßstab an sich an, aber nur wenn der Beweis eines völlig gleichmäßigen Baus erbracht sei, und eben dieser scheint ihm bei den Hochpolymeren nicht gesichert. Eine einzige Abweichung in der Kette, etwa ein Ring oder ein quartäres C müßte die Viscosität erheblich ändern. Auch K. H. MEYER **65)** zweifelt nach Messungen an Kohlenwasserstoffen an, daß die spez. Viscos. wirklich dem Molgewicht proportional sei. Dagegen wendet ST. **66)** ein, daß MEYER an noch zu kurzen Ketten gearbeitet habe (unter 30 C); wählt man genügend hochmolekulare Paraffine, so stimmt die Regel auch bei diesen.

Zu Gunsten der Theorie STAUDINGER's sprechen weiterhin die Spreitungs-versuche von KATZ **67)** mit Äthern und Estern der Cellulose, Amylose etc. Ihre Ausbreitung auf Wasseroberflächen spricht für eindimensionale, höchstens zweidimensionale Ausbildung der Moleküle, aber gegen dreidimensionale, also gegen die aus „Bündeln" bestehenden Micelle; es gibt entweder nur molekular-dispers verteilte Ketten oder Blättchen, mit einer Dicke von nur 1—2 C. Ganz ähnlich verhalten sich auch bereits abgebaute Stoffe, so Acetate, das HESS'sche Biosan u. a.

Moleküle oder Micelle? Es sei hier noch ganz kurz erwähnt, daß die Diskussion zwischen STAUDINGER und MEYER-MARK nicht nur um die Kettenlänge geht, sondern

---

59) ***H. Staudinger c. s.,*** z. B. Mol. Gew. Best. an Acetylcellulosen. Ber. Chem. Ges., **63,** 2331 (1930). — 60) ***H. Staudinger,*** Hochpolymere Verbind. 50 (Vortrag). Zs. physikal. Chem., A **153,** 391. — 61) ***Ders.,*** dass. 57. ebd. **158,** 35 (1931). — 62) ***Ders.,*** dass. 58, 59. Helv. Chim. Acta, **14,** 1370 (1931), **15,** 213 (1932). — 63) ***Ders.,*** Viscositätsgesetz. Zs. Elektrochem., **40,** 434 (1934). Ber. Chem. Ges., **67,** 1242 (1934). S.A. — 64) ***P. Karrer, C. Ferri,*** Viscositäten etc. (gegen STAUDINGER). Helv. Chim. Acta, **17,** 358 (1934). — 65) ***K. H. Meyer, A. van der Wijk,*** Viscosität etc. (gegen STAUDINGER). Zs. Elektrochem., **40,** 446 (1934). — 66) ***H. Staudinger, F. Staiger,*** Viscos.-Mess. an Paraffinen. Ber. Chem. Ges., **68,** 707 (1935). — 67) ***J. R. Katz, P. J. P. Samwel,*** Ausbreit. hochmol. Subst. . . . auf e. Wasseroberfl. etc. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **472,** 241, **474,** 296.

auch um den Anspruch STAUDINGER's, daß seine Riesenketten echte Moleküle, Makromoleküle sind. So weittragend diese neuen Untersuchungen der Grundbegriffe für die theoretische Chemie sind, für unsere specialistischen Zwecken dienende Darstellung haben sie keine unmittelbare Bedeutung.

Auch hier stehen sich die Ansichten und Definitionen von STAUDINGER und MEYER-MARK noch unausgeglichen gegenüber. STAUDINGER bezeichnet seine einheitlich gebauten Riesenketten als Makro-Moleküle, während MEYER-MARK auf diese Bezeichnung gänzlich verzichten, und die von ihnen angenommen mäßig langen, in ihrer Länge nicht einheitlichen, dem Associat zugrundeliegenden Ketten als Hauptvalenzketten bezeichnen. Es geht hier um nichts Geringeres als eine erneute Umformung und Neubegründung des Molekülbegriffes an sich. Vom klassischen Molekülbegriff muß man hier ganz absehen, da er ja nur frei bewegliche Teilchen im Gaszustand oder in Lösung umfaßt hat; diesen mußte man ja schon modifiziren, als man Molekülgitter in Kristallen anerkannte. Aber auch der daraufhin neu präzisirte Molekülbegriff für „ideale Kristalle" (WEISSENBERG 68)) ist hier nicht anwendbar, weil diese kryptokristallinen Gebilde alles andere sind als ideale Kristalle. Er gilt überhaupt nur für solche Kristalle, die aus räumlich allseitig begrenzten Teilchen, Mikrobausteinen, bestehen; nicht aber für solche, die räumlich in einer oder mehreren Richtungen unbegrenzte (Ketten-, Netz- oder Gitter-)Bausteine enthalten, wie dies hier zweifellos der Fall ist, indem bei z. B. der Cellulose eine Schraubenachse auftritt, an der sich die Identitätsperiode von $2 \times C_6$ immer wieder ohne notwendige Begrenzung wiederholt. Es entsteht hier also eine besondere Art von sozusagen „Molekülen", eben die „Makromoleküle" STAUDINGER's. Um nun den Molekülbegriff zu halten, verläßt STAUDINGER bewußt die klassische Grundlage, daß nämlich das Molekül die letzte kinetische, d. h. frei bewegliche (oder beweglich gedachte) Einheit ist; er gibt eine rein chemisch strukturbedingte Definition. Für ihn ist ein Molekül jeder chemische Stoff, der nur „normale Covalenzen" enthält, d. h. nur Hauptvalenzen, weder heteropolare Ionenbindungen noch Valenzen höherer Ordnung. Er nennt somit auch einen Diamantkristall ein Molekül, und führt weiter aus, daß somit das „Molgewicht" eines Diamanten proportional ist seinem Gewicht, daß also ein Kristall von 1 g Gewicht ein Molgew. von $6{,}06 \times 10^{23}$ hat (l. c. 6).

Das ist nun aber sozusagen eine Definition post hoc; STAUDINGER nennt seine nur durch Hauptvalenzen gebundenen Gebilde Moleküle und dann definirt er dementsprechend den Begriff Molekül. Außerdem ist der Begriff „normale Covalenz" nicht scharf definirbar, da zwischen Hauptvalenzen und Nebenvalenzen keine Kluft aufspringt; sie sind vielmehr dem Grunde nach dasselbe, und nur durch Zahlengrößen ihrer Energien verschieden, und grade bei den Hochpolymeren treten nach K. H. MEYER Bindungsenergien aller Größen auf. Grade deswegen haben MEYER und MARK als einengendes Moment die geometrische Größe der Entfernung zweier Atome eingeführt, und nur solche als Hauptvalenzen definirt, bei denen diese Entfernung der in normalen Molekülen entspricht, also weniger als 1,6 Å.

STAUDINGER's Definition ist also nicht absolut scharf zu präzisiren. Aber sie hat noch das weitere Bedenken gegen sich, daß sie etwas nicht enthält, was nun einmal zur Idee des Moleküls gehört: die Einheitlichkeit. MEYER und MARK betonen, daß man nicht darauf verzichten kann, als Moleküle nur unter sich streng identische Teilchen zu bezeichnen. Dies ist hier nun zweifellos nicht der Fall; weder die STAUDINGER'schen Ketten bei seinen synthetischen hochmolekularen Stoffen oder beim Kautschuk, noch die kürzeren Ketten MEYER-MARKS bei Polyosen oder Proteinen sind immer aus gleich viel Gliedern bestehend; sie sind also in bezug auf die Molgröße nicht homogen.

Aus diesem Grunde, ferner weil der Begriff „Molekül" anderweitig festgelegt ist (W. BILTZ 69)), und weil (nach ihrer Auffassung) auch diese Ketten nicht frei existenzfähig sind,

---

68) ***K. Weissenberg,*** Molekular-Theorie der Kristalle. Zs. physikal. Chem., A **189**, 529 (1928). — 69) ***W. Biltz,*** (Zum Molekülbegriff), Diskussionsbemerkung zu den Vorträgen STAUDINGER und K. H. MEYER. Zs. Elektrochem., **40**, 449 (1934).

sprechen MEYER und MARK diesen Micellen die Qualität eines Moleküles ab. Es ist nicht eine Kette von 100 einer von 50 echt „polymer", weil sie beide nichts anderes sind als „Cellulose"; der Hauptzug eines echten Moleküls, die äußeren Eigenschaften zu bestimmen, fehlt. MEYER und MARK bezeichnen diesen Kristallbautypus auch nicht als Molekülgitter, sondern als „Hauptvalenz-Kettengitter". Eine endgültige Verständigung der maßgebenden Forscher über diese Fragen steht also noch aus.

Wie gesagt, sind diese an sich ungemein wichtigen Fragen für uns nicht entscheidend. Für den enzymtypischen Abbau der Polyosen genügt uns die nunmehr sichere Grundlage, daß sie lange Ketten sind, und daß der Abbau nicht durch explosiven Zerfall eines Associats, sondern durch stufenweise Lösung von echten Hauptvalenzen erfolgt, was wie oben erwähnt die Zunahme der Dispersität automatisch nach sich zieht. Viel wichtiger für uns sind die weiteren Konstitutionsfragen. Diese sind zwar für die Cellulose nunmehr ziemlich bereinigt, aber für das wichtigste Enzymsubstrat, die Stärke, leider noch garnicht. Hier stehen noch alle principiellen Fragen offen.

I. Amylasen (Diastasen).

EINLEITUNG.

§ 365. Trotz der ungeheuren Arbeit, welche auf das Studium dieser Fermentgruppe und ihres Substrates, der Stärke, seit Generationen verwendet ist, und trotz der viel tiefer als je schürfenden modernen Methodik sowohl in der Untersuchung der Fermente an sich, wie der Konstitutionsforschung, stehen wir bei den Amylasen noch grundlegenden Problemen ziemlich hilflos gegenüber. Es liegt dies zum Hauptteil daran, daß uns der Aufbau des komplexen Substrates der Amylasen, der Stärke im Allgemeinsinne, noch viele Rätsel darbietet. Über den bisherigen Stand der Dinge s. außer im betr. Hauptteil des H.W. Band I insbesondere auch bei Hesse in Bd. IV des H.W. S. 12 ff.

„Stärke", das sind mindestens drei verschiedene Begriffe: die elektrolyt-freie Amylose, das phosphorsäurehaltige Amylopectin, und das ebenfalls phosphorsäurehaltige Glykogen. Alle drei werden durch „**Diastase**" gespalten, wenn wir nun dem allgemeinen Usus folgend diesen klassischen Namen nicht mehr als den Namen eines Enzyms führen wollen, sondern als den eines Präparates, wie „Invertin", „Emulsin", „Trypsin". Die enzymatische Spaltung dieser drei Stoffe ist nicht völlig gleichförmig, es treten Besonderheiten auf, die an die Möglichkeit verschiedener Amylasen auch in bezug auf die Reaktions-Specifität denken lassen. Es ist nämlich auch heute noch nicht klar, ob diese drei Erscheinungsformen der Stärke von gleicher oder verschiedener rein chemischer Struktur sind. Man hat Amylose rein chemisch den beiden anderen gegenübergestellt. Da andererseits Amylopectin und Glykogen strukturchemisch wohl sicher identisch sind, so stehen wir dann immer noch zwei chemisch differenzirten Stärke-gruppen gegenüber, die Samec als Amylokörper und Erythrokörper unterscheidet, indem er ihnen verschiedene Strukturen, etwa in bezug auf die Lage der Sauerstoffe zuschreibt. Andere lehnen jeden Strukturunterschied ab und erklären das verschiedene äußere Verhalten durch verschiedene Anordnung der Ketten oder physikochemisch als Dispersitäts- und Aufladungserscheinungen etc. Wir können also heute noch nicht sicher entscheiden, ob es in dieser Richtung nach der Specifität auf verschiedene chemische Gruppirungen von vornherein verschiedene Amylasen gibt, und seien sie auch nur insoweit verschieden, als das gleiche Grundferment zur Amylopectinspaltung eines anderen Aktivators bedarf, wie dies z. B. Pringsheim vertritt. Erst ganz neuerdings versuchen Samec und Waldschmidt-Leitz den Nachweis zu führen, daß die beiden nunmehr nachgewiesenen Typen der Amylase (α und β) jeweilig specifisch auf die Amylo- resp. Erythrogruppirung eingestellt sind (s. u.). Wir wissen weiter auch heute noch nicht sicher, ob es dasselbe Fermentsystem ist, das an den langen Ketten irgendwie die ersten glykosidischen Bindungen löst, und zunächst verkürzte Ketten mit geringerer Association, die halbkolloiden Dextrine bildet und diese dann weiter abbaut; oder ob eine Gruppe Dextrine bildet,

eine andere sie weiter zerlegt. Dieses Problem zweier Amylasen oder gar dreier, wenn man das „stärkeverflüssigende" Enzym noch mit einrechnet (H.W. S. 680), wird seit Jahrzehnten hin und wider gewälzt; es ist auch durch die endgiltige Festlegung zweier verschiedener Amylasetypen nicht gelöst worden; denn auch diese beiden Amylasen greifen sowohl genuine Stärke, wie andererseits noch das niedrigste bekannte „Dextrin", die Amylohexaose an. Ihre Verschiedenheit kann also nicht auf diese einfache Weise geklärt werden; sie wird vielmehr, wie eben erwähnt, auf die Specifität gegenüber den beiden angenommenen Strukturen bezogen.

Erst in allerjüngster Zeit hat WALDSCHMIDT-LEITZ **70)** angegeben, daß es außer diesen beiden Amylasen noch ein specifisches Enzym gibt, das nur genuine Stärke unter Abspaltung von Phosphorsäure angreift; es kann durch Adsorption an Kaolin abgetrennt werden, seine Wirkung wird durch Viscositätsmessungen verfolgt, gleichzeitig bilden sich reducirende Gruppen. Der Restkörper — der keine Maltose enthält — wird dann durch beide Amylasen normal weiter zerlegt. Auch dies kann also nicht das supponirte, nur „verflüssigende" Enzym sein, — das eben wahrscheinlich als rein desaggregirendes Enzym garnicht existirt. Eine vereinzelte Beobachtung von ZIESE **71)**, daß Oxy-aethyl-stärke von α-Amylase rein desaggregirend zerlegt wird, ist noch nicht zu deuten (§ 379).

Was nun die Zweiteilung der Amylasen anlangt in ein Enzym, das vorwiegend Stärke angreift und Dextrine bildet, ein anderes, das vorwiegend auf die Dextrine wirkt und aus ihnen Maltose bildet, so zieht sich diese Diskussion seit WIJSMAN (1899, H.W. *l. c. 155*, S. 678) hin, ohne daß die Dinge sich irgendwie geklärt hätten. Erst 1925 ist hierin eine entscheidende Wandlung eingetreten. Es gibt zweifellos zwei Typen von Amylasen (§ 379), aber die erhoffte Spezifität der Wirkung auf Amylose resp. Dextrine haben auch sie wieder nicht. Sie sind irgendwie verschieden nach ihrer Wirkung auf verschiedene Anordnungen in den Stärkeketten, und sie sind biologisch verschieden durch Unterschiede im Vorkommen, aber ganz sicher differenziren nach ihrer Eigenart können wir auch diese neuen Typen nicht. Sie sind auf zwei ganz verschiedenen Wegen unabhängig von einander entdeckt worden. Zuerst fand RICH. KUHN diese beiden Typen einerseits im Malz, andererseits im Pankreas. Sie unterscheiden sich dadurch, daß sie zwei verschiedene Maltosen erzeugen: die Malzamylase bildet primär β-Maltose, die des Pankreas α-Maltose, die dann natürlich beide zur Gleichgewichts-maltose mutarotiren. Zu gleicher Zeit konnte OHLSSON zwei Amylasen präparativ trennen, bei genauerer Untersuchung zeigte es sich, daß er damit eben die KUHN'schen Typen getrennt hatte. OHLSSON konnte sie ungefähr den beiden lange gesuchten „dextrinbildenden" und „zuckerbildenden" Amylasen gleichsetzen und benannte sie danach. Seine „Dextrinogen-amylase" entspricht der KUHN'schen α, seine „Saccharogen-amylase" der β. Die β-Am. bildet schneller Maltose; aber eine irgendwie scharfe Trennung der beiden Wirkungsbereiche ist auch wieder nicht möglich, denn beide greifen ja tatsächlich „Stärke" an, nicht etwa die eine nur Dextrine; aber vor allem greifen beide noch ganz niedere Abbaustufen, nämlich die Amylo-hexaose (**72)**) und das kristall. Dextrin mit 18 Gliedern (**73)**) an; aus allen diesen Stoffen bildet die α-Amylase wieder α-Maltose,

---

70) ***E. Waldschmidt-Leitz, K. Mayer,*** Amylophosphatase aus Gerste. Zs. phys. Ch. **236**, 168 (1935). S.A. — 71) ***W. Ziese,*** Einwirk. von Amyl. auf Oxyäthylstärke. Zs. phys. Chem., **229**, 213 (1934), **235**, 235 (1935). S.A. — 72) ***E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel,*** Krist. Hexaose aus Stärke. Zs. phys. Chem., **223**, 76 (1934). S.A. — 73) ***L. Köhler-Hollander,*** Kristallis. Erythrodextrin. ebd., **228**, 249 (1934).

die β-Amylase β-Maltose. Sie sind also irgendwie in der Wirkung verschieden, aber nicht so, daß man scharf Stufenwirkungen unterscheiden kann. Es ist vielmehr die α-Am. eingestellt auf die „Amylo-gruppirung", die β greift diese nicht an, sowohl in der Stärke wie in den Dextrinen (§§ 366a, 372, 379). Auch die ursprüngliche Annahme einer scharfen biologischen Trennung hat sich nicht bewahrheitet: alle Diastasen enthalten beide Typen, nur in verschiedener Relation. Sie müssen also beide zum totalen Stärkeabbau nötig sein, aber wie sie zusammenwirken, wissen wir nicht. Diese Frage ist erst mit dem Strukturproblem der Stärke selbst gemeinsam zu lösen, für das wiederum die Existenz dieser beiden Enzyme ganz neue Anregungen gegeben hat.

Eine weitere Verwirrung ist in die Frage des enzymatischen Totalabbaus hineingetragen worden. Es ist bisher das Definitionsmoment der Amylasen, daß sie Stärke angreifen und zu Maltose abbauen. Wo keine Maltase vorhanden ist, wird bei günstigen Bedingungen 100 % Maltose gebildet (§ 366). Es soll aber Spaltungen geben, bei denen primär überhaupt keine Maltose entsteht; sondern direkt Glucose. Diese Befunde sind vorläufig überhaupt nicht zu deuten; sie sind aber auch an sich zweifelhaft, resp. in neueren Nachprüfungen nicht bestätigt.

Alle diese Fermentprobleme sind nicht restlos zu lösen, ehe nicht der Aufbau der Stärke klargestellt ist, ehe wir also nicht davon ausgehen können, wo, d. h. an was für einer Art chemischer Gruppirung, diese Fermente ansetzen. Und ebendies liegt noch ziemlich im Argen und grade in den Fragen, die uns vom Fermentstandpunkt aus am meisten interessiren.

A. Chemie und Aufbau der Stärke.

1) Allgemeines.

§ 366. Die Chemie der Stärke, von jeher eines der schwierigsten Gebiete der Strukturforschung, hat naturgemäß seit dem Erscheinen des Hauptwerkes dieselben stürmischen Wandlungen durchgemacht, wie die der Polyosen überhaupt. Aber neben den allgemeinen Problemen treten hier doch noch eine ganze Reihe von Sonderproblemen hervor, welche die Cellulose-chemie nicht zu bearbeiten braucht. Beim Abbau der Stärke als Inbegriff der drei äußeren Erscheinungsformen Amylose, Amylopectin und Glykogen treten je nach den Bedingungen verschiedenartige einfache Stoffe auf, also auch dann, wenn wir von den unvollkommen abgebauten Zwischenstufen, den Dextrinen, vorerst ganz absehen wollen. Diese Tatsache gibt der Annahme Raum, daß sich eben der Abbau der Ketten nicht gradlinig vollzieht, wie die Ausschälung der vorhandenen Cellobiose-Reste beim Abbau der Cellulose, sondern daß die primär vorhandenen Baugruppen-Rümpfe in der Stärke nicht oder nicht alle dieselbe Struktur haben, wie das normale Endprodukt, die Maltose. (Die Säurespaltung zu Glucose sei, wie allgemein angenommen, als sekundäre Weiterzerlegung der Maltose betrachtet.) Beim Abbau der Stärke scheinen also Gelegenheiten zu allerlei Umlagerungen gegeben zu sein, die es fraglich erscheinen lassen, ob sie in gleicher Weise einfach aus Maltose aufgebaut ist, wie die Cellulose aus Cellobiose, ob nicht vielmehr andere Zucker in anderer Bindung vorherschen, vor allem, ob nicht alloiomorphe Glucosen in der Stärke existiren. Mit diesen sehr umstrittenen Fragen müssen wir uns nun eingehend beschäftigen.

Ebenso wie für die Cellulose galt bis zum Auftauchen der Vorstellungen der kleinen Elementarkörper die Annahme einer einfachen Kettenstruktur aus Glucosen, hier in α-Bindung. Dann traten, wie schon im H.W. berichtet (S. 643) diese Ideen zurück gegenüber der Annahme kleiner Grundkörper, die eben nur durch Valenzen höherer Ordnung zum Kolloid, zum „Molat" der verschiedenen Stärkeformen associirt sein sollten.

Die Art dieser Grundkörper blieb umstritten. Karrer (*l. c. 3*) nahm ein einfaches Maltosan an, ein Anhydrid der Maltose, Bergmann **74)** dagegen ein Anhydrid der Glucose selbst, ebenso wie Hess für die Cellulose. Er stellte ein Amylose-acetat her, das er für ein Acetylglucosan hielt; jedoch stellte Brigl **75)** fest, daß es hochmolekular sein muß. Pringsheim **76)** rechnete auch mit höheren Grundkörpern, und zwar verschiedenen für Amylose und Amylopectin. Amylose sollte aus einem Dihexosan aufgebaut sein, Amylopectin aus einem Trihexosan. Beide aber sind nicht von einer einfachen Maltose abzuleiten, sondern von einer Biose Amylobiose, die er durch kalte konz. HCl aus Amylose darstellen konnte. Bei der Diastasewirkung entsteht sie nicht, da das Enzym eben grade die — von der Maltose-Bindung verschiedene — Amylobiose-Bindung löst; Diastase sollte also ein Enzym Amylobiase

---

74) ***M. Bergmann, E. Knehe,*** Individ. Gruppe der Kartoffelstärke. Ann. Chem. Pharm. (Liebig), **452**, 141 (1927) S.A. — 75) ***P. Brigl, R. Schinle,*** Stärke-acetat. Ber. Chem. Ges., **62**, 99 (1929). — 76) ***H. Pringsheim,*** Konstit. der Stärke etc. Ber. Chem. Ges., **57**, 158 (1924). S.A.

enthalten, das er später mit der β-Amylase gleichsetzte (§ 368). Amylopectin enthält dementsprechend ein Anhydrid einer Amylotriose. Die darstellbaren Di- und Trihexosane sah PRINGSHEIM 77) nicht als die wahren Grundkörper an, da diese frei beständigen Stoffe nicht associiren; die wahren Grundkörper sollten ihnen nur ähnlich sein.

Es ist dann zuerst von PRINGSHEIM, dann vor allem von RICH. KUHN 78) der neue Gedanke in die Diskussion gebracht worden, daß die Zucker in den Baugruppen der Stärke sämtlich oder zum Teil nicht die normalen Pyranosen sein dürften, sondern irgend welche Sonderformen, also alloiomorphe Zucker. Eine solche Annahme müßte eine völlige Wandlung der Vorstellungen insofern herbeiführen, als auf dieser Basis viele nur auf normale Zucker passende Berechnungen optischer und kinetischer Natur ihre Grundlagen verlieren müßten. Andererseits würde aber auch die alte und höchst verworrene Frage nach den β-Bindungen in der Stärke ein ganz anderes Gesicht bekommen; denn es ist zwar das Vorhandensein normaler β-Bindungen an Pyranosen in der Stärke selbst sehr unwahrscheinlich, wohl aber könnten sie leicht an alloiomorphen Formen gegeben sein oder sekundär entstehen, wenn sich nach der Zerlegung die alloiomorphen Formen in Pyranosen umwandeln; denn bei solchen strukturellen Umwandlungen mit Öffnung und Neuschließung der Sauerstoffbrücken können ohne weiteres auch konfigurative Umwandlungen von α in β und umgekehrt vonstatten gehen. Darauf also stützte sich KUHN, er nahm einen Grundkörper an bestehend aus einer α-Di-glucose mit einer zweiten β-Bindung; mindestens eine der beiden Glucosen sollte alloiomorph sein. Diese Anregungen KUHN's sind zwar ursprünglich für den Fall kleiner Grundkörper gedacht, sie behalten aber ihren vollen Wert auch dann, wenn man nun die Kettenstruktur der Stärke annimmt; wir werden also auf diese Annahmen noch eingehend zurückzukommen haben.

Es ist also an sich die Kettenstruktur der Stärke allgemein angenommen; fraglich ist auch hier wieder die Länge der Ketten und somit, ob die Kettenbildung allein hinreicht, um das Voll-kolloid zu bilden. STAUDINGER selbst hat sich nicht sehr entschieden in dieser Frage geäußert, scheint aber doch der Annahme zuzuneigen, daß die Stärke ebenso wie die Cellulose aus sehr langen Ketten besteht mit einem Molgewicht bis zu 200 Glucosen. Dagegen spricht aber die chemische Untersuchung besonders durch die Schule HAWORTH, die wie § 364a angegeben auf kurze Ketten von etwa 24 Gliedern deutet. Ist dies der Fall, so müßte man hier die Ausbildung des Vollkolloids durch weitere Association im Sinne MEYER-MARKS zu deuten haben.

Die Hauptfrage aber ist, welcher Art diese Ketten sind, und darüber gibt es noch keine gesicherte Erkenntnis. An sich sprechen viele Beobachtungen dafür, daß sie komplizirt gebaut sind, und daß im Sinne KUHN's beim Abbau allerlei Umlagerungen vor sich gehen. Es liegen also gegen eine ganz einfache Kettenbildung aus normalen Pyranosen schwerwiegende Bedenken vor.

Die Sachlage ist nun eine sehr eigentümliche. Diese Bedenken entspringen in der Hauptsache, hier zunächst vorbehaltlich der späteren eingehenden Besprechung ganz allgemein ausgedrückt, den aus den Vorgängen beim Abbau entnommenen Beobachtungen und Schlüssen, vor allem den enzymatischen Vorgängen; so den Beobachtungen an den Wirkungen der beiden Amylase-typen, der Verfolgung der Jodreaktion im Verhältnis zur Maltose-bildung u. dgl., sowie wie erwähnt dem Auftreten von β-Maltose

77) ***H. Pringsheim, J. Leibowitz,*** Bez. zwischen opt. Dreh. Vermögen und Struktur in der Polysacch.-Chemie. ebd., **58,** 2808 (1925). — 78) ***R. Kuhn,*** Konst. der Stärke etc. Ber. Chem. Ges., **57,** 1965 (1924).

beim enzymatischen Abbau. Demgegenüber stehen rein chemisch-analytische Befunde, die ihrerseits dafür sprechen, daß Stärke aus nichts anderem besteht als aus normalen Ketten von Maltose. Wir stehen also vor der Frage, welche Methoden hier entscheidende Schlüsse gestatten. Die Gruppe hervorragender Forscher, die aus ihren chemischen und physiko-chemischen Untersuchungen heraus für die reine Maltose-Struktur stimmen, verschließen sich den genannten Bedenken durchaus nicht; aber sie halten sie für unwesentlich gegenüber ihren exakten Befunden. Sie halten also diese für entscheidend und stellen sich somit auf den Standpunkt, daß die ihrem Votum entgegenstehenden Befunde eine andere Erklärung finden müssen, die mit ihrer Grundauffassung vereinbar ist. Diese Grundauffassung ist kurz gesagt, daß die Stärke genau denselben ganz einfachen Aufbau hat wie die Cellulose, nur daß eben anstatt Cellobiose Maltose in den Ketten gebunden ist.

So haben HAWORTH c. s. (l. c. 29) **79, 80**) als unerschütterliche Tatsache hingestellt, daß Stärke jeglicher äußeren Erscheinungsform nichts weiter darstellt, als eine relativ kurze Kette von in α-Stellung als Maltose gebundenen Glucosen, mit einer Kettenlänge von 20—25 Gliedern, Glykogen noch weniger. Die α-Bindung vereinfacht das Bild noch insofern weiter, als dabei auch die bei der Cellulose rein strukturell erzwungene digonale Schraubung um die Kettenachse wegfällt, da die beiden Glucosen im Elementarkörper bei der Maltose nicht um einander gedreht sind wie bei der Cellobiose (Formel der Maltose-kette § 366a). Sie kehren also zu der Ansicht KARRER's zurück, daß Maltose, und ganz allein Maltose in der Stärke vorgebildet ist. Dies gilt, wie insbesondere HIRST (l. c. 54) betont hat, gleichmäßig für alle Arten von Stärke, die sich demnach strukturchemisch überhaupt in nichts unterscheiden. Ihre abweichenden Erscheinungsformen sind also ausschließlich dispersoidchemisch oder durch verschiedene räumliche Lagerung der Ketten zu erklären.

Diese folgenschweren Schlüsse beruhen auf den Ergebnissen der Methylirung von Stärke. Die voll methylirten Körper Trimethyl-amylose und Trimethyl-glykogen liefern bei der Aufspaltung ausschließlich Hexa-methyl-maltose und weiterhin nach Überführung in Octa-methyl-maltobionsäure und weitere Aufspaltung nur Derivate der Gluco-pyranose. (Näh. § 366a.)

Diese Befunde ergänzen den bereits von KARRER (*l. c. 3*) erhobenen, daß Stärke bei Behandlung mit Acetyl-bromid Acetobrom-maltose liefert, und von HÖNIG und RUŽICZKA **81**), daß Oxydation mit Brom Maltobionsäure ergibt, und zwar auch natürliche Stärke, d. h. einschl. Amylopectin. Sie widersprechen aber den Ergebnissen IRVINE's **82, 83**), der ebenfalls auf grund von Methylirungen zu einem ungleichmäßigen Aufbau der Stärke, auch mit „Isomaltose", und mit n- und am-Formen gelangt war, und die HAWORTH zu widerlegen sucht. IRVINE konnte nämlich mit der üblichen Methode nicht zu einer völligen Methylirung der Stärke gelangen (nur 7 Methyle anstatt 9 auf 3 Glucosen); vgl. die analogen Befunde bei α-Tetra-amylose (§ 371); auch diese Methylirung vollzieht sich noch in 2 Stufen; zuerst gehen leicht 2 Methyle in jeden Zuckerrest; also 6, das 7. nur mit besonderer Technik. Die letzten beiden Methyle sind nur nach einem anderen Verfahren (über die Chlorprodukte) einzuführen, so daß dann wirklich Methylo-Stärke entsteht.

Aus andern Gründen schließen sich auch FREUDENBERG (l. c. 38) **84**), sowie mit gewissen Bedenken K. H. MEYER **85**) der Annahme einer völlig einfachen Maltose-Struktur der Stärke an.

---

79) ***W. N. Haworth E. G. V. Percival,*** Contin. chains of α-Glucopyranose units in starch and glycogen. Jl. of Chem. Soc., **1931,** 1342. — 80) ***W. N. Haworth,*** Konstit. einiger Kohlenhydrate (Vortrag). Ber. Chem. Ges., **65,** A. 43 (1932). — 81) ***M. Hönig, W. Ružiczka,*** Oxyd. Abbau der Stärke mit Brom etc. Bioch. Zs., **218,** 397 (1930). — 82) ***J. C. Irvine, J. Macdonald,*** Molec. unit of starch. Jl. of Chem. Soc., **1926,** 1502. — 83) ***J. C. Irvine,*** Res. on the chem. of starch (Zusammenf.). Réc. Trav. chim., **48,** 813 (1929). — 84) ***K. Freudenberg,*** Chemie der Stärke etc. (Vortrag). Ang. Chemie, **1934,** 675. — 85) ***K. H. Meyer, H. Hopff, H. Mark,*** Konst. der Stärke. Ber. Chem. Ges., **62,** 1103 (1929). S.A.

FREUDENBERG stützt sich auch hier auf die kinetischen Messungen, die ihm mit gewissen Vorbehalten die Gleichwertigkeit aller Bindungen auch in der Stärke zu erweisen scheinen. HIBBERT 86) hat diese Annahme FREUDENBERG's viel schärfer postulirt und diese Gleichwertigkeit als erwiesen hingestellt; auch die viel langsamere Hydrolyse der Cellulose ist nach seiner Ansicht durch die langsamere Hydrolyse der Cellobiose an sich gegenüber der Maltose genügend geklärt.

K. H. MEYER c. s. 85) kommen schließlich durch Kombination mehrerer Argumente zur Annahme einer glatten Maltose-Struktur in der Stärke. Erstens durch kinetische Messungen, die ergaben, daß die Geschwindigkeit etwa der Maltose-spaltung entspricht, also wie bei FREUDENBERG auf eine gleichmäßige Struktur deutet. Zweitens aus Berechnungen der optischen Drehung nach den HUDSON'schen Regeln, die ergeben sollen, daß nur α-Brücken vorhanden sind.

Reine Stärke strebt einem Drehwert von + 220° zu, die Berechnung ergäbe für lauter α-Bindungen 226°, für lauter β nur ca. 20°; es müßten sich also schon wenige β-Bindungen geltend machen. Aber das bezieht sich natürlich wieder nur auf normale Glucosen; sobald man an alloiomorphe Zucker denkt, haben alle solche Berechnungen gar kein Fundament mehr.

Aus Röntgenaufnahmen der Stärke ist bisher nichts Exaktes zu berechnen, eine Überführung in bessere Diagramme zeigende Fasern ist bisher nicht gelungen. Es ist nur festzustellen, daß sowohl die Amylosen wie die Amylopectine kristallinisch sind, und daß es verschiedene Diagramme gibt, die wohl auch nur auf der verschiedenen Art der Bindung von Wasser beruhen (§ 372). Aus Betrachtungen am Raummodell ist zu schließen, daß die Maltoseketten ebenfalls in einer digonalen Schraubung angeordnet sind, und somit zickzackförmig verlaufen. Es ist also nur jede zweite glucosidische Brücke der vorangehenden gleichwertig, was erklärt, daß eben Maltose und nicht Glucose das bevorzugte Endziel der Spaltung ist; dieser Bau erklärt ferner die Empfindlichkeit gegen Wasser. MEYER kann sich den zahlreichen Unstimmigkeiten nicht verschließen, nimmt aber an, daß erst beim enzymatischen Abbau Verlagerungen nach Art einer WALDEN'schen Umkehrung verlaufen (s. a. § 367).

Was nun die strukturell bedingte Ausdehnung der Ketten anlangt, so stehen auch hier wie bei der Cellulose die beiden Ansichten bisher unvereint gegenüber. Die Annahme der Molekülkolloide im Sinne STAUDINGER's würde auch hier bedeuten, daß es sich um sehr lange, also an sich ins kolloidale Gebiet hineinreichende Ketten (ca. 200 Glucosen) handelt, während die Schule HAWORTH mit recht kurzen Ketten von wahrscheinlich 24 Gliedern rechnet. Dann wäre also die genuine Stärke an sich eine Micellbildung in verschiedenen Aggregationszuständen mit einem Molatgewicht von etwa 100.000; wie besonders SAMEC in zahlreichen Arbeiten begründet hat, gibt es verschiedene Stufen dieser Aggregation bei den verschiedenen Stärkearten, worauf wir § 372 zurückkommen.

Hier sei nur erwähnt, daß SAMEC 87) im Dunkelfeld die Aggregation direkt beobachten konnte. Frisch dargestellte Stärkesole (Elektrodialyse) zeigen BROWN'sche Bewegung. Diese hört aber allmählich auf, die Teilchen treten zu größeren Aggregaten zusammen, die freien Ultramikronen verschwinden. Die Bildungsdauer und Form dieser Aggregate ist verschieden; auch Dextrine verhalten sich ähnlich; auch hier finden sich durchgehende Unterschiede zwischen Amylokörpern und Erythrokörpern (§ 372). Auch Ultrafiltrate, niedermolekulare Dextrine zeigen kolloidchemische Alterungserscheinungen; jedoch handelt es sich hier nach SAMEC 88) um ganz flüchtige Ballungen, die durch Erwärmen rückgängig gemacht werden.

---

86) ***H. Hibbert, E. G. V. Percival,*** Compar. hydrol. of some ... polysacch. Jl. Amer. Chem. Soc., **52**, 3995 (1930). — 87) ***M. Samec,*** Verh. der Stärkesole im Dunkelfeld. Bioch. Zs., **195**, 40 (1928). — 88) ***Ders.,*** Mittl. Teilchengröße einiger Stärkesubst. etc. Koll. Beih., **37**, 91 (1932).

Endlich sei noch erwähnt, daß man zur Erklärung des Umstandes, daß Stärke garnicht reducirt, annehmen muß, daß sie — im Gegensatz zur Cellulose — auch am Kettenende keine „Aldehydgruppe" enthält. Freudenberg 84) vermutet aus Analogieschlüssen auf Grund seiner neuen Untersuchungen an Polyamylosen, die er für verkürzte Modelle der Stärkeketten hält, daß am Kettenende eine β-Anhydrobindung nach dem Typus des Laevoglucosans vorhanden ist; dieses Glucose-anhydrid ist ja aus Stärke erhältlich und eine Stütze der Annahme von „β-Bindungen" in der Stärke.

So wichtig diese Differenz, ob Molekülkolloid oder Micell, auch ist: in der Hauptfrage stimmen alle die genannten Forscher überein, daß Stärke nichts anderes ist als eine lange einförmige Kette von α-Maltosen.

§ 366a. Reine Maltosekette oder komplicirterer Aufbau? Alloiomorphe Zucker? Es ist natürlich überaus prekär, dieser völlig eindeutigen Aussage der führenden Forscher auf dem Stärkegebiet mit Bedenken und Zweifeln gegenüberzutreten, die aus ganz anderen Erwägungen heraus gezogen sind und — was nicht betont zu werden braucht — nicht etwa aus Zweifeln an den Arbeiten der Autoren an sich stammen.

Die grundlegende Bedeutung der optischen und kinetischen Messungen könnte man in Zweifel ziehen, wenn man im oben angedeuteten Sinne nicht mit einer fortlaufenden Kette von Glucopyranosen, sondern mit einer Kette von mindestens teilweise alloiomorphen Glucosen rechnen könnte. Denn über deren Verhalten können wir noch nichts aussagen, da wir ja nicht einmal wissen, was für alloiomorphe Formen eventuell vorhanden sind. Im übrigen lehnt Pringsheim ohnehin die optischen Messungen von Meyer-Mark (l. c. 85) wegen Unstimmigkeiten in den Zahlen ab (l. c. 3, S. 368).

Das stärkste Bollwerk aber sind die rein chemischen Abbauversuche von Haworth. Sie sind nach seiner absolut eindeutigen Aussage nur mit einer einfachen Kette von Maltose-Resten zu vereinbaren.

Die zuerst gefundene Tatsache, daß aus Stärke nach der Methylirung nur 2, 3, 6-Trimethylglucose entsteht, ist noch immer anders zu deuten. Sie kann an sich betrachtet nach Irvine, Pringsheim c.s. 89) (vgl. a. Irvine 82, 83)) darauf beruhen, daß in der Stärke tatsächlich, wie es die Maltose-kette verlangt, jeweilig die 5-Stellung für die pyroide Sauerstoffbrücke, und die 4-Stellung für die glucosidische Bindung in der Maltose bei der Methylirung frei bleibt; sie kann aber ebensogut darauf beruhen, daß in der Stärke eine Kette von Glucofuranosen < 1,4 > in 5-Stellung gebunden ist. Daß bei deren Spaltung die Umlagerung in pyroide Formen eintritt, hat Irvine dadurch wahrscheinlich gemacht, daß synthetisch hergestelltes Trimethyl-β-methyl-glucofuranosid bei der Hydrolyse 2, 3, 6-Trimethyl-glucopyranose liefert.

Diese Zerlegung der Stärke in 2, 3, 6-Trimethyl-n-glucose wäre also allein noch nicht ausschlaggebend; wohl aber ist es die Isolirung von zweifelfreien Maltose-Derivaten durch Haworth, wenn eben nicht bei der Methylirung selbst eine Umlagerung von alloiomorphen in pyroide Zucker in den Ketten vor sich geht. Und das eben weist Haworth auf grund seiner tiefgehenden Kenntnisse grade auf diesem Gebiete rundweg ab. Für ihn ist sein Verfahren absolut sicher geeignet, das wahre Gerüst der Stärke in Form von bekannten einfachen Stoffen aufzuzeigen, und dies ist eben ein Gerüst ausschließlich bestehend aus Maltose.

---

89) ***J. C. Irvine, H. Pringsheim, A. F. Skinner,*** Methyl. der α-Tetraamylose. Ber. Chem. Ges., **62**, 2372 (1929).

Wenn sich dies so verhält, so bleibt eben zur Erklärung der Erscheinungen beim andersartigen Stärkeabbau, und ganz besonders beim enzymatischen Abbau, nichts anderes übrig, als nunmehr hier Umlagerungen anzunehmen, Umlagerungen aus der stabilen α-Bindung von Glucopyranosen heraus in andere Formen, in β-Bindungen und in alloiomorphe Formen. Es ist schwierig sich das vorzustellen; aber unbeschadet der Autorität von HAWORTH zeigt eben doch der Stärkeabbau Erscheinungen, die vorläufig nicht anders zu deuten sind, als daß er nicht einheitlich verläuft, und daß eben allerlei labile Formen und Umlagerungen dabei angenommen werden müssen. Es seien also zunächst einmal kurz die Gesichtspunkte zusammengestellt, die es vorläufig unmöglich machen, leichten Herzens der Auffassung von der einfachen Maltose-Struktur zuzustimmen; auf Einzelheiten werden wir noch an den verschiedensten Stellen zurückkommen müssen. Wir wollen zur Vereinfachung dabei sogar zunächst noch einige grundsätzliche Fragen zurückstellen, nämlich erstens die, warum es absolut unmöglich zu sein scheint, rein chemisch zu Maltose selbst durch direkte Hydrolyse zu gelangen, während Amylase dies im günstigen Falle zu 100 % leistet; zweitens wie es möglich ist, daß bei völlig gleichartiger Kettenbildung nur Maltose zu 100 % entsteht, und garkeine Glucose (§ 367); und drittens ob „Stärke" strukturchemisch ein einheitlicher Begriff ist, d. h. Amylopectin und Glykogen nur durch die Elektrolytaufladung, resp. Phosphorylirung, und den Associationsgrad, resp. die Verschränkung der Ketten (HIRST, l. c. 54) verschieden sind; oder ob im Amylopectin ein dreiteiliger Grundkörper steckt. Wir wollen auch als vorläufig unwesentlich bei Seite stellen, daß nach HELFERICH 90) alle synthetischen Maltoside gegen alle Amylasen resistent sind. Es bleiben dann noch genug offene Fragen übrig.

Der Ausgangspunkt jeder Stärkeforschung ist natürlich, daß der enzymatische Abbau unter gewissen Umständen nur eine Maltose liefert, und zwar zu 100 %. Dieser Fundamentalsatz enthält aber zwei Einschränkungen, und daraus folgt alles Weitere.

Die erste Einschränkung lautet, daß nur „unter gewissen Umständen" aus Stärke 100 % Maltose entsteht. Denn sehr häufig bleibt bei einem Teil der Stärke dieser weitergehende Abbau durch Amylase aus, es resultirt ein Restkörper, ein „Grenzdextrin", das chemisch dem längst bekannten Dextrin Achroodextrin nahesteht. Nach PRINGSHEIM ist es identisch mit einem durch chemischen Abbau (z. B. Erhitzen in Glycerin), und zwar nur aus dem Amylopectin resp. Glykogen erhältlichen Trihexosan; aus Amylose entsteht es nicht, Amylose liefert vielmehr nur Maltose. Nur wenn die Amylase einen besonderen Hilfskörper, ein „Komplement" (§ 392) enthält, spaltet sie Stärke ganz zu Maltose auf. So komplettirte Amylase spaltet nun auch das isolirte Trihexosan in Maltose; da es sich um ein Dreizuckersystem handelt, muß also mindestens ein Teil dieser neugebildeten Maltose in rückläufiger Synthese gebildet sein. Dafür ist ohne Belang, ob dieser Körper wirklich ein Trihexosan oder nach SAMEC ein Trisaccharid, oder was er sonst ist; darauf kommen wir § 368, 369, 370 zurück. Daß dieses Trihexosan kein Zufallsprodukt ist, zeigt die Tatsache, daß es von dem so wählerischen Zymasesystem des Muskels (das z. B. Glucose kaum angreift) nach MEYERHOF in Milchsäure übergeführt wird. Trotzdem hält es PRINGSHEIM nicht für einen vorgebildeten Baustein des Amylopectins, sondern für ein Stabilisirungsprodukt durch Synthese aus unbeständigen primären Bausteinen. PRINGSHEIM's Ansicht wird in jeder Hinsicht bestritten; aber eine andere, bessere Erklärung ist nicht gegeben, um die Existenz dieses Restkörpers und sein Verhalten zu erklären (s. z. B. 91)).

---

90) ***B. Helferich, S. R. Petersen,*** Synth. einiger α-Maltoside. Ber. Chem. Ges., **68**, 790 (1935). — 91) ***R. Weidenhagen, A. Wolf,*** Z. Kenntn. der Stärke. Zs. V. D. Zuck., **80**, 264, 866 (1930).

Nach anderer Ansicht (LINTNER u. a.) ist dieser Restkörper ein aus 6 Glucosen bestehendes Gebilde, also ein Dextrin; auf diesen Restkörper kommen wir § 369 zurück. Andere Autoren wie LOHMANN, BARBOUR, SAMEC haben als resistente Restprodukte aus Glykogen, resp. Erythroamylose verschiedene Trisaccharide erhalten (§ 368), die man wohl schwerlich anders deuten kann wie als Stabilisirungsprodukte von labilen Zuckern.

Noch stärker wiegt der zweite Vorbehalt, daß „eine Maltose" entsteht, in dem implicite die Tatsache enthalten ist, daß nach R. KUHN **92)** je nach Art des Abbaus, nämlich durch verschiedene Enzyme, entweder die (nach unten mutarotirende) α-Maltose oder die (nach oben mutarotirende) β-Maltose entstehen kann (H.W. S. 645). Wie bereits erwähnt ist diese Tatsache inzwischen bestätigt **(91)** und näher geklärt worden dadurch, daß zwei auch sonst in der Wirkung verschiedene und sogar präparativ trennbare Amylasen existiren (OHLSSON, VAN KLINKENBERG **93)**), WALDSCHMIDT-LEITZ u. a., § 379), die α-Amylase oder Dextrinogen-Amylase, und die β- oder Saccharogen-Amylase. Daß hierbei nicht α- und β-Bindungen in der Stärke selbst anzunehmen nötig ist, oder gar eine Mischung zweier „mutamerer" α- und β-Amylosen, wie VAN KLINKENBERG **93, 94)** will (Näh. § 372), zeigt der überaus wichtige Befund von WALDSCHMIDT-LEITZ und REICHEL (l. c. 72), daß auch ihre einfache, kristallisirte und einheitliche Amylohexaose, ebenso wie das aus 18 Glucosen bestehende kristallisirte Dextrin KÖHLER's (l. c. 73) durch beide Amylasen wieder in Maltose zerlegt wird, und zwar indem dabei wieder je nachdem über β- oder α-Maltose Gleichgewichtsmaltose entsteht. Dagegen soll nach PRINGSHEIM nur die β-Amylase seine „Amylobiose" spalten (vgl. 334, 368). Diese Deutung ist ebenso fraglich wie die Existenz dieser Biose überhaupt. Nach SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 98) ist die α-Amylase bei ihrem Angriff auf die Stärke selbst eingestellt auf die „Amylogruppirung" (blaue Jodfarbe), nicht auf die Erythrogruppirung (rotviolette Jodfarbe), also auf Anordnungen in der Stärke selbst, auf die wir §§ 372, 379 näher eingehen werden. Diese bleiben also anscheinend bis zu der Hexaose herunter erhalten, so daß auch diese noch je nachdem α- oder β-Maltose liefern kann. Zur Erklärung dieses Auftretens einer β-Maltose als Spaltprodukt gibt es nun von vornherein drei Möglichkeiten.

Die erste ist notgedrungen von den Verfechtern der glatten α-Glucopyranose-Ketten in Maltosebindung vorgeschlagen worden: eine WALDEN'sche Umkehrung an der zuerst freigesetzten α-Maltose während der und durch die Enzymwirkung selbst. Dafür gibt es keine Begründung, als eben ihre Notwendigkeit, wenn die Maltose-Theorie richtig ist. Es wäre ein Unikum in der Enzymchemie, für das man allenfalls noch die Sachlage bei der Glucothiase im Myrosin heranziehen könnte (§ 363). KUHN und PRINGSHEIM (l. c. 3, S. 234, 368) lehnen die Annahme ab. Immerhin, — vielleicht kann sie doch eines Tages bewiesen werden und so die Unvereinbarkeit der Maltose-Theorie mit dem Auftreten von β-Maltose beseitigen.

Die zweite Möglichkeit ist das Vorhandensein von β-Bindungen in der Stärke selbst. Das ist ein altes Problem. Ein Grund zur Annahme von β-Bindungen ist das Entstehen von Laevoglucosan, (das zweifellos β ist), nach KARRER (*l. c. 15*) bei der trocknen Destillation der Stärke, und die häufige Bildung von Dextrinose, einer der rätselhaften „Isomaltosen" beim enzymatischen Abbau (§ 334).

---

92) ***R. Kuhn,*** Wirk. Mechan. der Amylasen. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **448,** 1 (1925). S.A. — 93) ***G. A. van Klinkenberg,*** Spezif. der Amylasen. Zs. phys. Chem., **209,** 253, **212,** 173 (1932). S.A. — 94) ***Ders.,*** Specif. Problem der Amylasen. Erg. Enzymforsch., III, 73 (1934).

Abgeschlossen: 12. 11. 35. Ber. Phys. 88, H. 3/4.

Aber auch damit sind die Erscheinungen nicht zu erklären. Auf den ersten Blick scheint eine Art Kompromiß mit der Präexistenz der Maltose möglich zu sein, nämlich wie folgt: die Maltosereste sind untereinander in β-Bindung gekettet. Bei der Spaltung mit Malzamylase, die ein β-Enzym ist, werden diese β-Bindungen gelöst, die α-Bindungen nicht, es bleibt Maltose (und zwar als β-Maltose) unzerlegt zurück. Aber auch das stimmt nicht. Nehmen wir nämlich Pankreasamylase, so löst diese die α-Bindungen, also (supponirt) die in der Maltose selbst vorhandenen; dann blieben aber die β-Bindungen zwischen 2 Glucosen unangegriffen, und es müßte regelmäßig eine β-Glucosido-Glucose entstehen, die man aber beim Enzymabbau nur unregelmäßig und in geringer Menge auffindet. Außerdem widerstreitet diese Scheindeutung der Annahme von der völlig einheitlichen Art der Bindung, insbesondere also den kinetischen Messungen FREUDENBERG's. β-Bindungen von normalen Glucosen können also nicht präformirt sein.

PRINGSHEIM 95) hat denn auch mit aller Deutlichkeit die These vertreten und l. c. 3, S. 236 weiter begründet, daß es in der Stärke keine echten β-Bindungen gibt (s. a. H.W. S. 649). Echte β-Bindungen, das will besagen, daß es sich um β-Bindungen in Pyranosiden handelt, die dadurch charakterisirt sind, daß sie durch β-Glucosidase (Emulsin) spaltbar sind. Wo solche Stoffe auftreten, wie eben die Dextrinose, oder das aus Stärke durch Glycerolspaltung entstehende, durch Emulsin spaltbare Trihexosan PICTET's 96), so sind sie eben sekundär entstanden; entweder durch eine reine Konfigurationsänderung aus normalen α-Pyranosido-Bindungen, — was eben HAWORTH und K. H. MEYER annehmen, was aber schwer vorzustellen ist, s. o.—; oder sie sind durch Strukturänderung aus alloiomorphen Glucosen entstanden. Dann ist es eine sekundäre — und vorläufig nicht zu beantwortende — Frage, ob solche alloiomorphen Formen nur in α-Bindung oder auch in β-Bindung präformirt sind; denn bei der Öffnung und Neuschließung der Sauerstoffbrücken kann ja auch jede beliebige Konfigurationsänderung am C_1 mit unterlaufen.

Dieser Schluß, daß in der Stärke alloiomorphe Glucosen vorhanden sein müssen, ist von PRINGSHEIM 95) aus chemischen Befunden gezogen worden, und dann von R. KUHN (l. c. 92) auf grund seiner Ergebnisse mit den beiden Amylasen eingehend begründet worden. Auch JOSEPHSON 97) hat sich dieser Ansicht in seinem Versuch angeschlossen, ein zusammenhängendes Bild vom Aufbau der Stärke im Assimilationsprozeß zu geben. Die Tatsache, daß aus derselben Stärke — und wie wir jetzt durch WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 72) wissen, sogar aus der zweifellos einheitlichen Amylohexaose — je nach der Art des Enzyms entweder β-Maltose oder α-Maltose entstehen kann, ist nach KUHN eben nicht anders zu deuten, als daß beim Zerfall der Ketten gleichzeitig strukturelle Umformungen an labilen Zuckerresten erfolgen müssen. Die beiden Amylasen müssen verschiedene Angriffspunkte haben, sonst wäre ja ihre verschiedene Wirkung von vornherein nicht zu erklären; und damit ist ausgesagt, daß eben die Ketten nicht gleichförmig sind; entweder wechseln pyroide und alloiomorphe Glucosen ab, oder verschieden strukturirte labile Zucker; oder nur dieselben alloiomorphen Zucker in α- und β-Bindung.

Es muß dazu aus dem H.W. S. 645 wiederholt werden, daß KUHN's Bezeichnung „α"- oder „β"-Amylase in keiner Weise irgend etwas über die α- oder β-Bindungen im Substrat aussagen soll. KUHN will damit nichts weiter kennzeichnen, als daß eben β-Amylase β-Maltose

---

95) ***H. Pringsheim***, Konst. der Stärke. Ber. Chem. Ges., **57**, 1581 (1924). S.A. — 96) ***A. Pictet, R. Salzmann***, Sur la trihexosane. Helv. Chim. Acta, **7**, 934 (1924). — 97) ***K. Josephson***, Theorie der Stärkebildung. Zs. phys. Chem., **174**, 179 (1928).

erzeugt und umgekehrt. Wir wissen tatsächlich noch nicht, — von einer normalen pyroiden β-Bindung nun abgesehen —, ob die labilen Zucker in der Stärke teilweise β sind, wie es die primäre Entstehung der β-Maltose auf den ersten Blick vermuten läßt, oder ob hier die β-Stellung am C_1 auch erst mit der strukturellen Umwandlung entsteht. Ebensowenig wissen wir, welche Zuckerformen in der Stärke vorhanden sind. Darüber noch einige Worte § 367. Man wird natürlich zunächst an die furoiden Formen denken, doch ist das nicht unumgänglich, und schließlich kommen auch noch die Enolformen in Frage.

Wie nach KUHN's Ansicht die reguläre Spaltung in α- resp. β-Maltose aus solchen glykosidischen Bindungen zwischen ganz oder teilweise alloiomorphen Zuckerresten vor sich gehen kann, ist bereits im H.W. S. 652 ausgeführt, z. T. wörtlich zitirt. Die β-Amylase greift zwischen den eigentlichen Baugruppen ein, zwischen den Glucosido-glucosen mit einem oder zwei am-Zuckern. Dann erfolgt also die Umlagerung an der freien Glucose, in der reducirenden Hälfte; dann entsteht β-Maltose. Die α-Amylase greift an der Glucosidbindung selbst an, dann muß die Umlagerung in der gebundenen Glucose, im nichtreducirenden Teil erfolgen, und dabei wird — wie am Anstieg des Drehungsvermögens vor der Mutarotation ersichtlich — auch die andere Glucose in die α-Konfiguration übergeführt, es entsteht α-Maltose. Danach scheint KUHN anzunehmen, daß in der genuinen Stärke die sozusagen β-Bindungen überwiegen. Neben diesen Hauptreaktionen können bei diesen komplicirten Vorgängen allerlei Nebenreaktione interveniren, interglucosidische Umlagerungen, die z. B. zu den Trisacchariden etc. führen.

Gegen die Einheitlichkeit der sämtlichen Bindungen in der Stärke sprechen schließlich auch die Studien über das Verhalten der **Jodreaktion** beim enzymatischen Abbau. Wir kommen später ausführlicher auf die Frage der Ursachen der verschiedenen Jodfärbungen zurück (§§ 371, 372); hier sei nur die Hauptsache angedeutet. Nach SAMEC ist die blaue oder rotviolette Jodfärbung eine Frage nicht allein, nicht einmal vorwiegend der kolloidalen Association, sondern die Färbung hängt in der Hauptsache von chemischen Strukturen ab. Es gibt von vornherein zwei chemisch unterschiedene Stoffe in der Stärke, die blau färbende Amylo-amylose und die rot färbende Erythro-amylose, die aus dem Amylopectin, durch Kochen und Elektro-dialyse, entsteht. Die Blaufärbung beruht also auf einer besonderen „Amylo-struktur"; denn wenn man nun enzymatisch abbaut, so wirken beide Amylasen ganz verschieden **(98)**). Die α-Amylase (Pankreas) zerstört diese besondere Amylostruktur sehr schnell, β-Amylase (Gerste) läßt die Blaufärbung, ebenso wie die auf der gleichen Gruppe beruhende Koagulationsfähigkeit, bis zu einem sehr vorgeschrittenen Stadium der Verzuckerung (90 %) bestehen **(99)**).

Es ist also die α-Amylase eingestellt auf die Amylogruppirung, die β-Amylase läßt sie zunächst bestehen. Beide Gruppen sind in den natürlichen Stärkearten vorhanden, aber in verschiedener Mächtigkeit: in der Amylo-amylose mehr die erstere, in der Erythro-amylose mehr die letztere. Beide Gruppen in der Stärke sind also verschieden, und die Verschiedenheit ist bedingt, wie eben grade die Jodreaktion zeigt, durch die verschiedenen Restaffinitäten an den Sauerstoffbrücken, also entweder durch verschiedene Ringspannungen oder durch räumlich verschieden gelagerte Hydroxyle oder durch Beides. Es ist nicht notwendig, dafür eine besondere typische rotfärbende Gruppirung anzunehmen, obgleich diese vielleicht existirt. Es genügt aber, eine einzige blaufärbende Gruppirung anzunehmen. Dann ist die Rotfärbung

---

98) ***M. Samec, E. Waldschmidt-Leitz,*** Spaltbark. der Amylo- und Erythrokörper aus Stärke. Zs. phys. Chem. **203,** 16 (1931). S.A. — 99) ***M. Samec,*** Wirk. von β-Am. auf einige Stärkesubst. Zs. phys. Ch. **236,** 105 (1935). S.A.

dadurch zu erklären, daß die blau färbende Gruppe z. T. nicht frei ist, und so die Affinität zum Jod herabgesetzt ist, denn die Rotfärbung ist an sich nur eine Minderaufnahme von Jod.

Jedenfalls sind also nach dieser Ansicht die beiden Stärkearten strukturell verschieden, was natürlich wieder von den Anhängern der reinen Maltose-Ketten bestritten werden muß (vgl. Hirst l. c. 54).

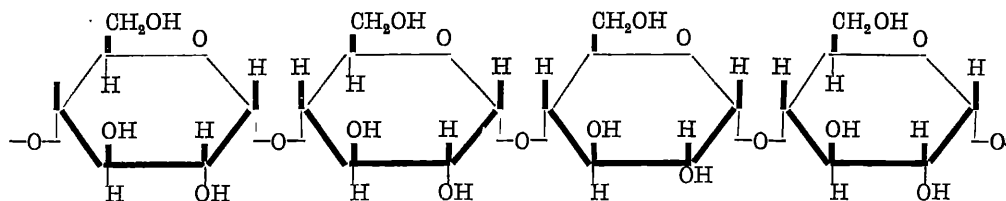
Zu dieser Frage sei schließlich noch ein Argument herangezogen, das zwar keine direkte Beweiskraft hat, weil es keine exakten Tatsachen aufzuweisen in der Lage ist, wohl aber eine sehr erhebliche indirekte. Dies ist das **biochemische Verhalten der Stärke** und des Glykogens resp. ihrer diastatischen Spaltprodukte gegen die zuckerabbauenden (glykolytischen) Enzyme der tierischen Zellen im Unterschiede gegenüber den Enzymen der Hefen. Während bei den Hefen sich die aus Stärke entstandenen Spaltprodukte ebenso verhalten wie die normalen Zucker, ist dies bei tierischen Zellen ganz anders, zum mindesten dann, wenn man Extrakte aus den beiden Zellarten verwendet. Dadurch, daß ein Teil des „zymatischen" Systems bei Tierzellen nur sehr spärlich und schnell verschwindend in Extrakte übergeht, bei den Hefen reichlich, kann man den Prozeß der Umsetzung normaler Zucker in zwei Etappen sondern, von denen die erste beim Abbau der diastatischen Spaltprodukte gänzlich fehlt, jene Etappe, die man als den „ersten Angriff" der Zucker zu bezeichnen pflegt. Der Sachverhalt ist folgender:

Der Abbau der Zucker in den tierischen Zellen findet entweder ähnlich wie bei der Hefe über verschiedene Phosphorsäure-Ester statt, oder ohne Phosphorylirung. Dieser letztere Vorgang ist noch wenig geklärt. Der wichtigste Zuckerabbau, der im Muskel, erfolgt jedenfalls über PhS-Ester. Nun greift Extrakt aus Muskel (außer wenn er ganz frisch ist, und dann eine geringe Wirkung aufweist) normale Zucker überhaupt nicht an, wohl aber greift dieses Extrakt die — nach Wirkung der Amylase des Muskels entstandenen — Spaltprodukte des Glykogens an, ferner das Pringsheim'sche Trihexosan und das (furoide) Zymophosphat. Zum Angreifen der normalen Zucker gehört ein weiteres Agens, das sich auch im Muskel vorfindet, aber nur spärlich und leicht vergänglich in Extrakte übergeht, das sich aber aus Hefe als thermo-labiles Prinzip isoliren läßt, also wahrscheinlich ein besonderes Enzym ist, die Hexokinase Meyerhof's. Jedenfalls also müssen normale Zucker erst umgeformt werden, ehe sie enzymtypisch dasselbe Verhalten zeigen, wie es das furoide Zymophosphat und die genuinen Spaltprodukte des Glykogens aufweisen.

Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß das gegebene Substrat der Glykolyse labile Zuckerformen sind, und daß der erste Akt des Angriffes der normalen Hexosen eben eine Umlagerung in diese „Reaktionsform" ist, während der Zucker des Blutes, stets Gluco-pyranose, nur eine „Transportform" ist. Diese Transportform wird den Zellen zugeleitet, umgeformt und in furoider Form (oder Enolform) zu Glykogen aufgebaut, das stets diesen Zellen als einzige Kohlenhydrat-quelle dient.

Wir können hier auf diese Fragen nur hindeuten, da bisher rein chemisch über diese Stoffwechselvorgänge vom Glykogen aus noch nichts bekannt ist. Es fehlt noch die Kenntnis der allerersten Stufen; die ersten greifbaren Produkte sind die Zucker-Phosphate, von denen das nach der neuesten Auffassung wichtigste, das Zymo-phosphat, die Fructose-di-PhS., furoid ist (§ 286). Vermutlich ist dieser Stoff die temporäre Stabilisirungsform der primär entstehenden labilen Hexose; vielleicht ist die erste eigentliche Abbauphase das gemeinsame Enol von Glucose, Fructose und Mannose, wie schon vor längerer Zeit Neuberg annahm und Harden heute wieder vertritt. In diesem Zusammenhang sei nur kurz darauf hingedeutet, daß grade Maltose ein biologisch recht minderwertiger Zucker ist und als entscheidend wichtiges Abbauprodukt des Glykogens für den Zellstoffwechsel kaum in Frage kommen kann. Sie bildet viel schlechter Glykogen als einfache Hexosen und geht im Muskel nicht in Milchsäure über.

Wenn auch diese biochemischen Überlegungen nicht an und für sich die Schlüsse von HAWORTH widerlegen können, so unterstützen sie doch die anderen Argumente, die wir geltend gemacht haben und die zusammen ausreichen, gewisse Bedenken gegen diese Annahmen zu äußern. Die feineren Strukturprobleme der Stärke können also noch nicht als geklärt angesehen werden.

Es sei zum Schluß ohne weitere Erörterung das Schema verbundener Maltosereste wiedergegeben, wie es HAWORTH (l. c. 46, S. 86) entworfen hat.

Verbundene Maltosereste in α-Bindung nach HAWORTH.

HAWORTH diskutirt im Anschluß daran noch verschiedene räumliche Modelle der Stärke, worauf hier nur hingedeutet werden kann. Endlich geben wir hier noch das digonal orientirte Raummodell der Stärke nach K. H. MEYER (l. c. 85) im Vergleich zu seinem Cellulose-modell.

2) Die Zucker.

§ 367. Die grundlegenden Tatsachen sind schon im H.W. berichtet; sie haben seither nur eine z. T. neue Beleuchtung erfahren. Im übrigen haben die Erkenntnis der entstehenden Zucker resp. die daraus gezogenen Schlüsse und Ansichten auch nicht wesentlich dazu beigetragen, den Rätseln des Aufbaus der Stärke näher zu kommen. Im Gegenteil bestehen hier alte Unklarheiten fort, und neue sind dazugekommen.

Maltose. Beim diastatischen Stärke-abbau entsteht unter besonders günstigen Bedingungen schließlich nur α, β-Gleichgewichtsmaltose, d. h. 105 % an Gewicht der angewandten Stärke. Im Allgemeinen aber macht bei Kartoffelstärke der Abbau Halt, wenn etwa 70 % der möglichen Maltose gebildet sind (vgl. a. H.W. Bd. IV, S. 15). Aus welchen Ursachen dieses Aufhören des Abbaus eintritt, ist z. T. bereits im H.W. S. 647 erörtert worden. Es kann sich u. U. um ein „falsches Gleichgewicht" handeln, aber diese Erklärung reicht nicht aus. PRINGSHEIM (*l. c. 13*) zeigte, daß hier eine tatsächliche Resistenz eines Teiles des Substrates auftritt, daß aus Amylopectin ein gegen Amylase an sich widerstandsfähiger „Restkörper" (§ 368) entsteht, der nach seinen Angaben nur dann weiter

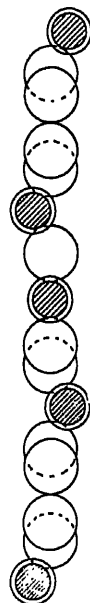



Abb. 34. Ausschnitt aus der Haupt-valenz-Kette der Cellulose.

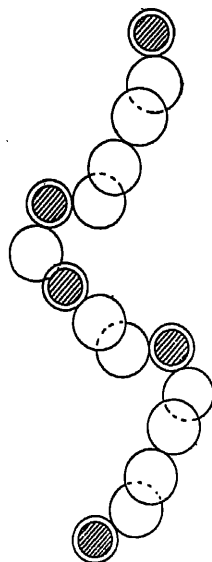



Abb. 35. Ausschnitt aus der Haupt-valenz-Kette der Stärke.

Die Figuren zeigen die Glucose-Ringe in seitlicher Betrachtung. Weiß: C-Atome, schraffirt: O-Atome; nach l. c. 85.

zerlegt wird, wenn die Amylase einen (natürlich in ihr enthaltenen oder künstlich zugesetzten) Aktivator besitzt, ein „Komplement". Dies kann Glutathion sein oder durch Glutathion ersetzt werden. Indessen wird seine Auslegung, daß hier ein ganz spezieller Aktivator vorliegt, allseitig abgelehnt (§ 392). Unter welchen Bedingungen also dieser Restkörper bestehen bleibt oder weiter zerlegt wird, ist noch unerklärt.

Dieser Restkörper ist nach PRINGSHEIM sehr nahestehend dem altbekannten Achroodextrin und besteht in der Hauptsache aus einem auch anderweitig zugänglichen Trihexosan. Seine Bildung hängt also mit der grundsätzlichen Frage der Entstehung dieser angeblich anhydrischen Hexosane beim Abbau überhaupt zusammen (§ 371). Man wird annehmen dürfen, daß es entweder ein Durchgangsprodukt ist, das nur bei Anwesenheit des sog. Komplementes weiter zerlegt wird; oder daß es kein Durchgangsprodukt ist, vielmehr bei Abwesenheit des Komplementes synthetisch entsteht, anstelle der Umlagerung der labilen Zucker zu Maltose. In jedem Falle ist die Wirkung des Komplementes ebenso wenig bisher zu erhellen wie die chemische Natur des Körpers selbst. Die Weiterzerlegung dieses Trihexosans in 100 % Maltose führt wieder in die nicht aufgeklärten Schwierigkeiten der Maltosebildung überhaupt zurück. Denn entweder muß vorher Material zur Synthese eines Trihexosans vorhanden gewesen sein, d. h. eine Monose, oder sie muß nachher bei der Spaltung des Trihexosans freiwerden und sich mit einem anderen Molekül Monose zu Maltose vereinigen. Im übrigen haben andere kein Trihexosan, sondern Trisaccharide gefunden (§ 368); diese Schwierigkeiten werden dadurch nicht geändert.

In jedem Falle ist die ganz ausschließliche und quantitative Entstehung von Maltose an sich schon ein gewisses Problem für die Auffassung, daß die Stärke ganz allein aus einer einzigen Art von Bindungen aufgebaut ist. FREUDENBERG (l. c. 26) hat mit vollem Recht darauf hingewiesen, daß aus Cellulose Cellobiose nur zu 30—67 % entstehen kann (je nach dem Maße, in dem sich die Biose ihrer Weiter-zerlegung durch schnelles Auskristallisiren entzieht), wenn man nicht ihre Ausschälung aus einem Associat, sondern ihre Bildung durch Ketten-spaltung annimmt, und hat grade diese Tatsache für die Kettenstruktur verwertet. Tatsächlich ergibt ja die Säurespaltung (durch verdünnte Säuren, von der angeblichen Amylobiosebildung durch konz. HCl sehen wir ab) nur Glucose, was also für eine volle Gleichheit aller Bindungen spricht. Amylase liefert aber ausschließlich Maltose. Wie dies mit einer absoluten Gleichheit der sämtlichen Bindungen vereinbar ist, ist zunächst nicht ersichtlich. Denn ohne jegliche Hypothese ergibt sich daraus der einfache Schluß, daß das Enzym in jedem Falle und völlig regelmäßig immer nur jede zweite Bindung löst, eben die zwischen zwei „Maltosen", d. h. allgemeiner ausgedrückt zwischen zwei Baugruppen aus je 2 Glucosen, niemals aber die innerhalb dieser Baugruppe befindlichen Bindungen. Es ist also ganz zweifellos jede zweite Bindung etwas „anders" und gegen das Enzym resistent; was dieses „anders" strukturell betrachtet bedeuten könnte, haben wir § 366a versucht zu klären. Wenn aber die Bindungen völlig gleichförmig wären, d. h. wenn jede Glucose einmal in C_1, einmal in C_4 eine Sauerstoffbrücke zur nächsten Glucose links und rechts aufwiese, und alle diese Bindungen α sind (vgl. die Projektionsformel § 366a), so ist jede Bindung auch für das Enzym gleichbedeutend, und es sollte eigentlich nur Glucose entstehen. Dies ist selbstverständlich auch denen zum Bewußtsein gekommen, die jede Art von β-Bindungen oder alloiomorphen Zuckern ablehnen; sie diskutiren deshalb räumliche Lagerungen, so HAWORTH und MEYER (l. c. 85). MEYER entwirft ein Raummodell (§ 366a) mit einem

100) ***H. Pringsheim, A. Beiser,*** Komplement der Amylasen, III. Bioch. Zs., **148**, 336.

zickzackförmigen Verlauf der Kette; dadurch wird es bewirkt, daß absolute Gleichwertigkeit der Bindungen immer nur bei jedem zweiten Glucose-rest auftritt. Dasselbe wie für die enzymatische Hydrolyse soll nach MEYER für den totalen Übergang durch Acetyl-bromid in Derivate der Maltose gelten, es handelt sich hier um eine micellare Oberflächenreaktion, wie ja bei der Enzymwirkung auch.

Aber noch viel drängendere Fragen wirft die ja § 366a vom Struktur-standpunkt aus eingehend behandelte Frage auf, wie die Bildung der beiden Maltosen durch die beiden Arten von Amylase zu erklären ist. Dies wurde gleichzeitig von R. KUHN und v. EULER **101)** (Bildung von β-Maltose durch Malzamylase) entdeckt und von OHLSSON bestätigt. Hier braucht also nur wiederholt zu werden, daß die Maltose wie alle Zucker an dem reduzirenden C_1-Atom der freien Glucose in zwei stereomeren Formen existirt, die durch Mutarotation in die Gleichgewichts-maltose übergehen.

α-Maltose hat nach HUDSON (bestätigt von KUHN) $[\alpha]_D = 168°$, β-Maltose = 118°, α, β-Gleichgewichtsmaltose = 136°. α-Amylase bildet nur α-Maltose, β-Amylase nur β. Die Erklärung kann nur die sein: entweder bei der β-Maltose eine WALDEN'sche Umkehrung oder Umlagerungen aus einer alloiomorphen Form in die pyroide mit gleichzeitiger Änderung der Konfiguration.

§ **368. Andere Biosen.** Neben der Maltose spielen in der Stärkechemie eine leider sehr unklare Rolle zwei weitere Glucosido-glucosen, Dextrinose und Amylobiose.

Dextrinose ist eine der Glucosido-glucosen des ebenso alten wie heute noch nebelhaften Problems der „Isomaltose", das wir als solches § 334 behandelt haben. Der Name Dextrinose stammt von SYNIEWSKI (1902); sie hat nach Angabe der Autoren weder mit der eigentlichen Isomaltose EMIL FISCHER's (durch rein chemische Synthese aus Glucose erhalten), noch mit der durch enzymatische Synthese aus Glucose gebildeten Revertose HILL's irgend etwas zu schaffen.

Dagegen soll Dextrinose diejenige „Isomaltose" sein, die nach alten, immer wieder angezweifelten und immer erneut erhobenen Befunden (H.W. S. 648) bei der Gärung resp. dem diastatischen Stärkeabbau entstehen soll. LING u. NANJI **102)** wollen Dextrinose aus Stärke über ihr Trisaccharid erhalten haben; es soll die Dextrinose aus diesem durch Maltase-wirkung entstehen. GEORG u. PICTET **103, 104)** haben Dextrinose aus Stärke über ein Trihexosan, und zwar ihr Iso-trihexosan, dann aber durch Säurespaltung gewonnen, und zwar direkt oder nach vorheriger Depolymerisirung zu einem Dihexosan (§ 371).

Die Frage nach der Existenz und nach der Struktur dieser Biose steht so recht im Mittelpunkt aller der ungelösten Probleme des Stärkebaues, soweit die Autoren solche Probleme überhaupt noch anerkennen. Erstens ist ihre reelle Sonderexistenz durchaus noch nicht erwiesen, trotzdem sie nun angeblich leichter und sicherer zugänglich ist; zweitens ist ihr Verhältnis zur ebenso umstrittenen Amylobiose noch unklar, die auf ähnlichen Wege entsteht und wohl sicherlich kein reiner Körper ist (s. u.), und endlich ist es grade durch die neueren Untersuchungen zweifelhaft, ob diese Dextrinose tatsächlich β-Bindungen enthält, das will sagen, ob sie überhaupt auch nur grundsätzlich mit der „Isomaltose" etwas zu tun hat. LING u. NANJI **102)** fanden sie durch gewöhnliche Hefen vergärbar, wahrscheinlich weil sie zuerst langsam in Maltose übergeht; langsamer durch Oberhefen. LING **105)** fand weiter, daß sie durch Diastase partiell in Maltose übergeht. SOMOGYI **106)** gibt neuerdings wieder an, daß eine

101) ***H. v. Euler, K. Helleberg,*** Drehung der bei der Stärkespalt.... auftret. Maltose. Zs. phys. Chem., **139,** 24 (1924). — 102) ***A. R. Ling, D. R. Nanji,*** Nature of polymer. amyloses. Jl. of Chem. Soc., **123,** 2666, **127,** 629 (1923/5). — 103) ***A. Georg, A. Pictet,*** Isomaltose. Helv. Chim., A. **9,** 444, 612 (1926). S.A. — 104) ***A. Pictet, H. Vogel,*** Nouv. sér. des prod. de dépolym. de l'amidon. Helv. Chim. A. **12,** 700 (1929). — 105) ***A. R. Ling,*** Rec. advances in our knowledge of starch. Jl. of Soc. Chem. Ind., **46,** 279 (1927). — 106) ***M. Somogyi,*** Convers. prod. of starch etc. Jl. of biol. Chem., **105,** LXXXI (1934); BPh **81,** 591.

unvergärbare „Isomaltose" als normales Abbauprodukt der Enzymspaltung aus Stärke wie Glykogen entsteht; sie soll das Reduktionsvermögen der Dextrine vortäuschen.

Und endlich gibt PICTET selbst an, daß Dextrinose beim Acetyliren quantitativ in Maltose übergeht, was er für den Übergang einer Furanose in eine Pyranose ansieht; also ähnlich wie es PRINGSHEIM für seine Amylobiose annimmt. Da nun PICTET Dextrinose aus seinen neuen Isotrihexosanen erhielt, die er (§ 371) für die wahren Baugruppen der Stärke zu halten geneigt ist, so wäre die Frage, ob in der Dextrinose wirklich eine Furanose enthalten ist, wichtig für das gesamte Stärkeproblem; denn wir rechnen ja auch hier mit der Möglichkeit furoider Bindungen, die bei der strukturellen Umformung auch in β-Bindungen übergehen können. Ob nach alledem noch die frühere Vorstellung von einer echten β-Bindung in der Dextrinose aufrecht erhalten werden kann, sei dahingestellt. Aber selbst wenn dafür noch der Beweis erbracht werden sollte, so hätte dies keine Bedeutung mehr für die Frage des Vorkommens solcher echter β-Bindungen in der Stärke selbst (§ 366). Darum wäre es viel wichtiger, wenn man in der Dextrinose endgiltig alloiomorphe Zucker nachweisen oder ausschließen könnte; dasselbe gilt für die Amylobiose, auch wenn sie nicht einheitlich ist.

Amylobiose. Diese Biose hat PRINGSHEIM (H.W. S. 650) **107—109)** aus Stärke wie aus Di- und Trihexosanen und Poly-amylosen dargestellt, und zwar durch Spaltung mit kalter konz. HCl. Er gibt ihr die Struktur einer α-Glucosido-glucose mit einer Gluco-furanose (oder einer anderen alloiomorphen Form). Amylobiose wird durch α-Am. nicht angegriffen, wohl aber spezifisch durch β-Amylase, die demnach eine „Amylobiase" ist oder enthält. Durch Wirkung dieses Enzyms wird Amylobiose in Maltose umgewandelt.

Die im H.W. vorgeschlagenen Formeln mit einer 1, 6-Bindung sind überholt, da alle C_6-Gruppen in der Stärke frei sind (s. u.). PRINGSHEIM schlägt nunmehr die Formel einer 5-α-Glucosido-glucose $< 1{,}4 >$ vor. Amylobiose dreht rechts, $[\alpha]_D = +110°$, über optische Berechnungen an Amylobiose und -Triose s. **110)**. Die 1, 6-Bindung ist bei jedem Zucker, der aus Stärke herstammen soll, von vornherein auszuschließen, da nach KUHN **111)** ein Trihexosan aus Stärke nach Methylirung und Spaltung 6-Methylglucose ergibt; ebenso ist bereits erwähnt, daß die direkte Methylirung der Stärke und nachfolgende Spaltung regelmäßig 2, 3, 6-Trimethyl-glucose liefert. Es sind also alle CH_2OH-Gruppen in C_6 frei. Auch bei unvollkommener Methylirung entsteht nach Spaltung eine Dimethyl-glucose mit Methyl in C_6 **(112)**.

Mit normaler Diastase entsteht Amylobiose nicht; wohl aber wird sie nach SJÖBERG **113)** aus Amylose durch den lebenden *Saccharom. Saké* gebildet. Daneben entsteht ein Dihexosan; auch aus Amylopectin kann man sie derart erhalten, neben einem nicht näher untersuchten Körper (Trihexosan?). Ob diese Amylobiose wirklich als chemisches Individuum existirt, ist sehr zweifelhaft. KARRER **114)** und WEIDENHAGEN **115)** lehnen sie völlig ab, indem sie das Produkt als ein Gemisch von Dextrinen mit Maltose oder Glucose hinstellen. KARRER erhielt ein sehr ähnliches Produkt bei der Einwirkung von HCl auf Maltose, er ist geneigt, die Amylobiose als ein Gemisch von Zuckern mit Reversions-dextrinen anzusehen. WEIDENHAGEN erhielt ein solches Reversionsprodukt sogar aus Glucose, damit wäre also eine Verbindung zur FISCHER'schen Isomaltose hergestellt. Inzwischen hat sich ein neuer ähnlicher Zucker an-

---

107) ***H. Pringsheim, J. Leibowitz,*** Konstit. der Polyamylosen. Ber. Chem. Ges., **57**, 884, **59**, 991 (1924/6). S.A. — 108) ***H. Pringsheim,*** Konstit. der Stärke. ebd., **57**, 1581 (1924). S.A. — 109) ***H. Pringsheim, A. Steingroever,*** Amylobiose. ebd. **59**, 1001 (1926). S.A. — 110) ***C. S. Hudson, H. Pringsheim, J. Leibowitz,*** Rel. rotat. of amylobiose etc. Jl. Am. Chem. Soc., **48**, 288 (1926). — 111) ***R. Kuhn, W. Ziese,*** Verknüpf. Stelle der Traubenzuckerreste in der Stärke. Ber. Chem. Ges., **59**, 2314 (1926). — 112) ***L. Schmidt, M. Zentner,*** Methyl. an Stärke. Sitzber. Wiener Akad., B **137**, 111 (1928). — 113) ***K. Sjöberg,*** Spalt. der Stärke mit Sacch. Saké. Zs. phys. Chem., **162**, 223 (1927). — 114) ***P. Karrer,*** Isolichenin und Stärkeabbau. Zs. phys. Chem., **148**, 62 (1926). — 115) ***R. Weidenhagen, A. Wolf,*** Z. Kenntn. der Stärke. Zs. V. D. Zuck., **80**, 264, 866 (1930).

gefunden, die **Maltosose**, die SUTRA 116) bei der Acetolyse der Stärke erhalten haben will. Auch dieses Produkt soll eine Gluco-furanose und eine Pyranose enthalten und sich in Maltose umlagern.

Trisaccharide. Auch deren Entstehung beim Stärkeabbau gehört zu den schon grundsätzlich unklaren Fragen.

Wie bereits H.W. S. 648 berichtet soll nach LING u. NANJI (l. c. 102) aus dem Amylopectin (das ja auch nach PRINGSHEIM einen Dreizucker-kern enthält) bei hoher Temperatur durch Diastase eine **Hexotriose** entstehen. Sie hat nach ihrer Ansicht die Struktur einer β-Glucosido-maltose oder anders ausgedrückt α-Glucosido-dextrinose und soll bei der Zerlegung mit Maltase Dextrinose liefern. Die Angaben LING's über diesen Zucker sind aber unsicher (s. u.) und damit auch die Existenz dieses Trisaccharids mit seiner angeblichen β-Bindung; nach PRINGSHEIM existirt es tatsächlich überhaupt nicht. Er hat dafür ein anderes Trisaccharid bereit: aus seinem Trihexosan = Grenzdextrin soll durch Aufspaltung der Anhydridbindung eine **Amylo-triose** entstehen, die keine β-Bindung hat, sondern wie die Amylobiose strukturirt ist, nur eine furoide Glucose mehr enthält (117). (vgl. dazu auch HUDSON c. s., l. c. 110.) Amylotriose entsteht direkt aus Amylopectin und Glykogen durch kalte konz. HCl. Sie entsteht aber anscheinend auch aus Glykogen direkt durch das Muskel-ferment, wenn auch nicht sicher identifizirt (LOHMANN 118)). Es ist nämlich seltsamerweise dieses Trisaccharid nicht befähigt zu glykolysiren, im Gegensatz zum Trihexosan; nicht einmal bei Gegenwart von Hexokinase, mit der zusammen das Muskelenzym ja Glucose angreift (§ 366a).

Diese Angabe LOHMANN's wird insofern von BARBOUR 119) bestätigt, als er aus Glykogen durch zellfreie Muskelamylase (Näh. § 306) als ausschliessliches Produkt ein Trisaccharid erhalten hat, das von der Amylotriose verschieden, aber wieder nicht kristallisirt erhalten ist. Er hat versucht, es über die Acetylverbindung zu reinigen. Es zeigt eine Drehung von $[\alpha]_{Hg}$ = + 181°, Reduktion 31 % der Glucose, F. des Osazons = 186°. SOMOGYI **119a)** hat angegeben, daß Blutamylase dasselbe Trisaccharid liefert; ob er nach seinen letzten Angaben (l. c. 106) dies noch aufrecht erhält, ist aus der kurzen vorl. Mitt. nicht zu entnehmen; es könnte wie bei LING u. NANJI (l. c. 102) durch Maltase in Dextrinose übergehen.

Auf ganz ähnlichem Wege, nämlich aus Erythro-amylose durch α-Amylase (Pankreas) hat SAMEC **120)** ein nicht näher beschriebenes Trisaccharid erhalten. Ein weiteres Trisaccharid unbekannter Natur soll aus Stärke durch Biolase (s. u.) entstehen (PRINGSHEIM **121)**), das Ähnlichkeit mit dem von LING u. NANJI hat. Und noch eins hat PICTET (l. c. 104) aus seinen neuen Iso-trihexosan durch konz. HCl erhalten, eine Iso-trihexose, von allen anderen verschieden.

Alle diese Trisaccharide werden als verschieden beschrieben; wenn sie also überhaupt wirklich Trisaccharide sind, so kann man wohl annehmen, daß sie Gemische verschiedener solcher Zucker sind, die als mehr weniger zufällige Stabilisirungsprodukte irgendwelcher im Abbau der Polyosen entstehenden labilen Zuckerformen aufzufassen sind. Dies dürfte wohl auch für das LOHMANN-BARBOUR'sche durch Muskelenzym erzeugte Trisaccharid gelten, das aber dadurch für die Frage der alloiomorphen Zucker beim Glykogenabbau nur um so interessanter wird. Als ein physiologisches Durchgangsprodukt ist es schwerlich anzusehen; im übrigen wird die ganze Sache bestritten (§ 306).

Von höheren Oligosen ist aus Stärke bisher nur die kristallisirte Amylohexaose neben noch höheren kristallisirten Dextrinen erhalten worden **(122)**. Sie ist aus dem Gemisch der Aufspaltung von Erythro-amylose (SAMEC) mit Pankreas-amylase zu ge-

116) ***R. Sutra,*** Acétolyse de l'amidon. C. R. **195**, 1079, 1282 (1932). — 117) ***H. Pringsheim, K. Wolfsohn,*** Amylobiose etc. Ber. Chem. Ges. **57**, 1591 (1924). — 118) ***K. Lohmann,*** Hydrol. des Glykogens durch das diast. Ferm. des Muskels. Bioch. Zs., **178**, 444 (1926). — 119) ***A. D. Barbour,*** Enz. hydrol. of glykogen. Jl. of Biol. Chem., **85**, 29 (1929). — 119a) ***M. Somogyi,*** Blood diast. Proc. Soc. Exp. Biol. **29**, 1126 (1932). — 120) ***M. Samec,*** Auftreten eines Trisacch. bei der Hydrol. der Erythro-amylosen etc. (Serbisch, Zusammenf. dtsch.) Glasn. Hemiskog Društva Kralj. Jugoslv., **5**, 1 (1934). S.A. — 121) ***H. Pringsheim, E. Schapiro,*** Ferm. Abbau der Stärke durch Biolase. Ber. Chem. Ges., **59**, 996 (1926). — 122) ***E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel,*** Krist. Hexaose aus Stärke. Zs. phys. Chem., **228**, 76 (1934). S.A.

winnen. Sie ist insofern schon ein „Dextrin", als Maltase sie nicht mehr angreift, wohl aber beide Amylasen, in jedem Falle entsteht 100 % Maltose (§ 366a). Wir kommen also beim Kapitel Dextrine (§ 369) nochmals darauf zurück.

Auf rein chemischem Wege hat aus acetylirter Stärke nach Methylirung durch fractionirte Destillation im Vakuum FREUDENBERG (l. c. 145) die Methylderivate von Maltotriose und Maltotetraose als sirupöse Massen erhalten.

Glucose. Die Frage, ob unter gewissen Umständen auch enzymatisch (wie durch Säure stets) aus Stärke direkt, dh. unter Umgebung des Maltosestadiums, Glucose entstehen kann, ist theoretisch sehr wichtig, aber noch sehr unbefriedigend geklärt. Wie alle Stärkeabbaufragen ist auch diese schon alt; schon BROWN und MILLAR hatten 1899 mit vorher auf 50° erhitzter Amylase reichlich Glucose erhalten. Später fand z. B. LINTNER (l. c. 137) Glucose, wenn er auf sein Grenzdextrin Takadiastase einwirken ließ; hier liegt aber wohl sicher Maltase-Wirkung vor. Dann hatte PRINGSHEIM **123)** mit einem Gemisch beider Amylasen (§ 379) bis zu 100 % Glucose erhalten, jedoch wurden diese Versuche unter anderem von RONA **124)** bestritten und später von ihm selbst (l. c. 3, S. 238) als unsicher bezeichnet. SOMOGYI (l. c. 106) gibt wieder Glucose als normales Abbauprodukt an. Dagegen haben SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ **125)** mit gereinigten Amylasen in Mischung, bei opt. ph und Aktivirung, weder aus Amylo- noch aus Erythro-amylose eine Spaltung über Maltose hinaus, also bis zur Glucose erzielen können.

Wohl aber soll der maltasefreie *Sacch. ludwigii* nach GOTTSCHALK **126)** direkt Glucose bilden; ebenso nach PRINGSHEIM **121)** das technische Enzympräparat Biolase, das nach neueren Mitteilungen aus Lupinensamen stammt (WREDE **127)**); letzteres aber nur bei gewöhnlicher Temperatur, während bei 70° ein Trisaccharid entsteht. Die Glucosebildung konnte GLIMM **127a)** bestätigen.

3) Die Dextrine.

§ 369. Das Kapitel Dextrine, das der früheren Forschung so unerhörte Schwierigkeiten gemacht hat, können wir heute nach Annahme der Kettentheorie grundsätzlich mit wenigen Worten abmachen. Daß es sich um an sich undefinirbare Gemische von allerlei ineinander gemengten Abbaustufen handelt, haben wir bereits im H.W. S. 653 betont, aber dort ist noch der Anschauung vertreten worden, daß die „Dextrine", soweit sie nicht oder nur schwach reduciren, aus dem Aggregat losgelöste Grundkörper selbst sind. Diese Vorstellung ist heute nicht mehr zulässig. Da der Abbau der Ketten in jedem Falle mit einer hydrolytischen Auflösung von Glykosidbindungen einhergeht, so sind auch die Dextrine nicht mehr „Grundkörper", sondern verkürzte Ketten mit grundsätzlich freien Carbonylen (d. h. Lactol-gruppen) am Ende, die reduciren.

Die Reduktion aller Dextrine niederer Stufen steht fest; nur beim Amylodextrin ist sie nicht sichergestellt; hier kann die Reduktion des Abbaugemisches auf die Gegenwart eines niederen Dextrins bezogen werden; für reines Amylodextrin lauten die Angaben verschieden; jedoch hat SAMEC (l. c. 133) die Angabe von LINTNER u. DÜLL bestätigt, daß es nicht reducirt.

123) ***H. Pringsheim, J. Leibowitz,*** α- und β-Amylasen. Ber. Chem. Ges., 58, 1262, 59, 991 (1925/26). S.A. — 124) ***P. Rona, J. Hefter,*** Gleichzeit. Einw. von Speichel-, Pankreas-, Malzamylase auf Stärke. Bioch. Zs., 217, 113 (1930). — 125) ***M. Samec, E. Waldschmidt-Leitz,*** Enz. Spaltbark. der Amylo- und Erythrokörper etc. Zs. phys. Chem., 203, 16, (31) (1931). S.A. — 126) ***A. Gottschalk,*** Aufbau und Vergär. von Glykogen d. maltasefreie Hefen. Zs. phys. Chem., 152, 132 (1926). — 127) ***H. Wrede,*** Verflüss. von Stärke mittelst Biolase. Der Papierfabrikant, 27, (Techn. Teil, Cellulosechemie) 197 (1929). — 127a) ***E. Glimm, L. v. Gizycki,*** Biolase. Bioch. Zs., 248, 449 (1932).

Die anderen Dextrine reduciren; aber die Werte werden sehr verschieden angegeben. Jedenfalls ist eine zahlenmäßige Beziehung zur Molgröße resp. der Kettenlänge nicht ersichtlich. Es ist dies vielleicht so zu erklären, daß auch bei den Dextrinen z. T. die Form gebildet wird, die FREUDENBERG (l. c. 84) vermutungsweise der — nicht reducirenden — nativen Stärke zuschreibt, nämlich von Ketten mit anhydrischen Enden, vergleichbar den Poly-amylosen (§ 366). Manche Dextrin-präparate wären dann Gemische von reducirenden und nicht reducirenden, anhydrischen Dextrinen; am wenigsten gilt dies für die stark reducirenden niederen Stufen, die Achroodextrine, bei denen anscheinend die Reduktion ein wirkliches reciprokes Maß der Kettenlänge ist. Es besteht sogar bei den höheren Dextrinen die Möglichkeit, daß sie an sich gänzlich in demselben Zustand sind wie die Stärke, d. h. mit anhydrischen Endgruppen, so daß sie also genau denselben Bau hätten und nur innere glykosidische Bindungen gespalten sind. Denn sie könnten sich bei der Präparation durch weiteren spontanen Zerfall so verändern, daß neben dem eigentlichen Dextrin noch niedere Stufen, vielleicht sogar Zucker, entstehen. Einen solchen Spontan-Zerfall will EFFRONT **128)** beobachtet haben.

Danach zerfallen die Dextrine schon beim Schütteln mit Wasser. Daß dabei sogar Zucker entstehen, soll die starke Senkung des Drehwertes nach Zusatz von NaOH erweisen, die reine Dextrine nicht geben. Diese „Autohydrolyse" tritt weder bei Stärke noch bei Achroodextrin auf, bei Amylodextrin mehr als bei Erythrodextrin. EFFRONT zieht daraus tatsächlich den Schluß, daß die höheren Dextrine an sich nicht reduciren, und folgert daraus weiter, daß der Abbau der Stärke derart vor sich geht, daß immer eine Maltose abgespalten und das nächstniedere nicht reducirende Dextrin gebildet wird (§ 373).

Lassen wir diese Unklarheit bei Seite, so sind jedenfalls die Dextrine im Bau der Stärke sehr ähnlich, nur mit kürzeren Ketten, und entstehen aus ihr auf enzymatischen Wege. Sie sind also im Gegensatz zu den Polyamylosen und den meisten Hexosanen durchaus physiologische Stoffe, und so ist es kein Wunder, wenn sie auch darin der Stärke nahestehen. JOSZT **129)** zeigte, daß verschiedene Dextrine der Alge *Spirogyra* als Nährsubstrat für den Stärkeaufbau dienen können, direkt oder über die Spaltung zu Zuckern. Dextrine sind also von vornherein keine „chemischen Stoffe", sondern an sich undefinirbare Gemenge von Abbaustufen verschiedener Kettenlänge, genau vergleichbar mit den „Peptonen" des Eiweißabbaus, die aller Wahrscheinlichkeit nach auch nichts weiter sind als Polypeptidketten verschiedener Länge. Leider gibt es noch keine dementsprechende Bezeichnung für die in den Dextrinen verbundenen Glucoseketten; vielleicht könnte man sie entspr. dem gewohnten Klang der Polypeptide **Polyamylide** nennen, um sie von den Hexosanen, Polyamylosen u.s.w. zu trennen. Polyamylide wären also zu definiren als die beim normalen hydrolytischen Abbau aus Stärke gebildeten, der Stärke selbst ihrem Bauplan gemäß polymer-homologen Ketten von beliebiger Länge, deren chemische Struktur immer noch genau dieselbe Signatur trägt, wie die Ketten in der Stärke selbst. Das will sagen, daß auch in den Dextrinen noch dieselben Bindungen vorliegen, um die heute noch bei der genuinen Stärke der Streit geht, ob es einfache Maltosebindungen sind oder irgend welche Bindungen zwischen alloiomorphen Zuckern. Daß dies bei den Dextrinen tatsächlich der Fall ist, ergibt sich mit größter Wahrscheinlichkeit daraus, daß auch bei dem sozusagen niedrigsten „Dextrin", der Amylohexaose, nach WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 122) noch dasselbe Problem auftritt, wie bei der Stärke selbst: es wird durch die beiden Amylasen je nachdem 100 % α- oder β-Maltose gebildet, die dann erst zur Gleichgewichtsmaltose mutarotiren. Es tauchen also bei allen Dextrinen grundsätzlich dieselben Strukturprobleme wieder auf, wie bei der Stärke selbst, und werden bei den wenigen Individuen akut, die man aus diesen Gemischen präparativ herausgearbeitet hat, ins-

---

128) ***J. Effront***, Autohydrol. des dextrines diast. C. R., **192**, 198 (1931). — 129) ***A. Joszt***, ***M. Kuniński***, Physiol. einiger Syniewski-Dextrine. Zs. phys. Chem., **191**, 65 (1930).

besondere also bei dem auch heute noch in jeder Beziehung unklaren „Grenzdextrin" des diastatischen Abbaus, das wir schon im H.W. S. 654 eingehend besprochen haben, bei dem noch dazu die ebenso unentschiedene Frage wieder auftaucht, ob die verschiedenen Erscheinungsformen der Stärke strukturell verschieden sind.

Alle Versuche, über diese wenigen Falle hinaus die Dextrine unter sich nach Gruppen zu ordnen, sind für praktische Zwecke wichtig, für die theoretische Klassificirung besagen sie garnichts. Denn wir wissen jetzt, daß das übliche Schema der Einteilung nach der Jodreaktion in blaufärbende Amylodextrine und rotviolettfärbende Erythrodextrine für die Kettenlänge, also den Grad des Abbaus nichts aussagt.

Denn wir können heute mit Sicherheit sagen, daß weder das Auftreten der Jodreaktion überhaupt, noch ihre Nüance auch nur in der Hauptsache von der mittleren Molatgröße der Stärkeart oder Dextrinart, also der eigentlichen Kettenlänge und dem Ballungszustand abhängt, wie besonders aus den Untersuchungen von Samec **130—133)** hervorgeht. Er fand u.a., daß den beiden Hauptbestandteilen der Stärke, nämlich der an sich P-freien Amyloamylose wie dem vom P befreiten Amylopectin, der Erythroamylose, unbeschadet des etwa gleichen kolloiden Ballungszustandes die blaue, resp. violette Jodfärbung eigen ist; und im nächsten Abschnitt werden wir sehen, daß nach Pringsheim anscheinend noch niedrige Abbauprodukte des nicht hydrolytischen Abbaus von Amylose, resp. Glykogen die blaue, resp. braune Jodfärbung aufweisen. Die Jodreaktion ist also jedenfalls nicht nur von einer reinen Oberflächenbindung (Adsorption) abhängig, sondern zum mindesten auch eine Reaktion auf bestimmte Strukturen, von denen Nebenvalenzen ausgehen; vielleicht also direkt auf alloiomorphe Strukturen, wie auch Kuhn vermutet. Bergmann **134)** fand Jodreaktionen auch bei ganz einfachen 1,2 Cyclo-acetalen, und schließt aus diesen Analogien auf eine Jodbindung an besondere Sauerstoffbrücken. Andererseits ist nach Samec auch die Bindung an PbS und durch diese an Kationen ohne Einfluß, wie überhaupt der Elektrolytgehalt. Es liegt also auch hier wieder der so häufig beobachtete Fall vor, daß zwischen Adsorptionsbindung und Nebenvalenzbindung kein qualitativer Unterschied zu machen ist, denn an sich vollzieht sich die Reaktion zweifellos nach den Adsorptionsgesetzen, z. B. ist bei Amylose an sich die Aufnahme um so größer, je stärker die Amylose dispergirt ist.

Diese Beziehung auf die Struktur ist nun nicht etwa so aufzufassen, als ob blaue und rote Jodfarbe der Beweis für ganz verschiedene „chemische Verbindungen" wären. Die blaue Farbe ist vielmehr an sich nur ein Beweis für sehr reichliche „Adsorption", d. h. für eine starke Nebenvalenz-Affinität; ist diese schwächer, so reicht die Bindung nur zur Ausbildung der roten Farbe aus. Das kann — wie bereits § 366a bemerkt — nach Samec und Waldschmidt-Leitz (l. c. 125) ebensowohl bedeuten, daß blaufärbende und rotfärbende Gruppen an sich verschieden und von verschiedener Affinität sind, wie daß die eine einheitliche färbende Gruppe in ihrer Affinität durch anderweitige Bindungen geschwächt ist, wie dies vielleicht durch den andersartigen Bau der Erythrokörper bedingt ist, z. B. in der Art, daß ein erheblicher Teil der „blau-aktiven" Gruppen gebunden ist. Es ist dann sogar möglich — und vielleicht bei den Retrogradationsprodukten Maquenne's (H.W. S. 661) tatsächlich der Fall — daß sehr hoch associirte Produkte die Jodreaktion überhaupt nicht mehr geben, weil die aktive Gruppe total abgebunden ist, oder durch dispersoidchemische Vorgänge, etwa eine Komplex-Koacervation im Sinne Bungenberg de Jong's gradezu verdeckt ist, wie Broeze **134a)** vermutet; van Klinkenberg (l. c. 93) nimmt ja sogar an, daß eine nicht mit Jod färbende Stärke (seine β-Stärke) den Hauptanteil der natürlichen Stärke darstellt.

---

130) ***M. Samec, A. Mayer,*** Synthet. Amylophosphorsäuren. Koll. Chem. Beih., **16,** 89 (1922). — 131) ***M. Samec,*** Propr. chim. coll. des comp. de l'amidon. C. R., **181,** 477 (1925). — 132) ***M. Samec,*** Verh. der Stärkekompon. zu Jod etc. Koll. Chem. Beih., **21,** 55 (1925). — 133) ***M. Samec,*** Stärkedextrine. Bioch. Zs., **187,** 120 (1927). S.A. — 134) ***M. Bergmann,*** Jodverbind. einfacher Cyclo-acetale etc. Ber. Chem. Ges., **57,** 753 (1924). — 134a) ***J. R. Broeze,*** Einwirk. des Ptyalins auf Stärke. Bioch. Zs., **204,** 286 (1929). S.A.

Wir betonen dies schon hier, den Erörterungen über die beiden verschieden färbenden Anteile der genuinen Stärke vorgreifend, um zu zeigen, daß jeder Versuch, nur auf Grund der verschiedenen Jodreaktion bestimmte einheitliche Stufen im Abbau festzulegen, vergeblich sein muß. Die alte Vorstellung, daß überall von den hochmolekularen blaufärbenden Amylodextrinen über die weniger hochmolekularen Erythrodextrine zu den nicht mehr färbenden Achroodextrinen ein glatter Weg führt, ist aufzugeben; denn die „Amylo"- und „Erythro"-Strukturen sind z. T. von vornherein gegeben und verhalten sich beim diastatischen Abbau verschieden. Nur grade bei dem freilich wichtigsten Objekt, der Kartoffelstärke und den ihr nahestehenden, verläuft die Jodreaktion parallel mit dem kolloid-chemisch beobachteten Abbau (§ 373).

Auch hier ergibt sich nur im allgemeinen, daß die blaufärbenden Produkte eine größere Neigung zur kolloidalen Association zeigen, also höhere Molatgewichte haben und darin der genuinen Stärke noch näher stehen. SAMEC **133)** hat sie sogar noch höher gefunden, als früher LINTNER, BILTZ u. a. Er gibt für die nach LINTNER und DÜLL hergestellten Dextrine an: Amylodextrin 36800, Erythrodextrin 10670. Aber das Amylodextrin läßt sich durch Elektrodialyse zerlegen in eine (P-freie) Solphase und eine (P-haltige) Gelphase, ist also nicht einheitlich; diese Phasen verhalten sich auch gegen Jod verschieden: die an sich viel weiter dispergierte Solphase färbt blau, die höher komplexe Gelphase wie das Amylopectin rot. Eine „Erythro"-Stufe bildet sich also immer zwischen genuiner Stärke und Achroodextrin; aber bei den Dextrinen aus der Amylose ist sie auf einen engen Molat-Bereich beschränkt, eben wirklich nur ein Übergang, während sie bei den Dextrinen aus Amylopectin von Anfang an bis zur Achroodextrinstufe reicht.

Auch das **„Amylose-Dextrin"** KLASON's **135)** ist wohl nicht einheitlich, das er durch lange Behandlung von Stärke mit kalter HCl erhielt. Es färbt rot, gibt aber in konz. Lösung einen Niederschlag, der blau färbt. Die aus kryoskopischer Bestimmung errechnete Molgrösse von 16 Glucosen (2125) ist willkürlich. Malz-Amylase gibt β-Maltose neben dem Dihexosan SJÖBERG's (l. c. 113); es stammt also aus der Amylose. — Dagegen stammt nach SAMEC **133)** das durch *Bac. macerans* entstehende gummöse Dextrin aus dem Amylopectin, ist P-haltig, ziegelrote Jodfarbe, hoch aggregiert.

§ 370. Definirte Dextrine. Wenn die Dextrine als „Polyamylide" Gemische der verschiedensten Abbaustufen sind, so besteht wie bei den Polypeptiden die Möglichkeit, präparativ aus allen Stadien definirte chemische Stoffe herauszubekommen; und dies ist in der Tat bisher in einigen Fällen gelungen. Das niederste „Dextrin" ist die mehrfach erwähnte **Amylohexaose** von WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 122). Sie steht an der Schwelle zu den höheren Zuckern, ist aber enzymtypisch noch ein Dextrin; denn sie ist unspaltbar durch Maltase, spaltbar durch beide Amylasen, und zwar zu 100 % Maltose. Durch β-Amylase entsteht β-Maltose und umgekehrt (§ 367). α-Amylase zerlegt sie langsamer als Erythro-amylose, aus der sie gewonnen wird.

W.-L. isolirte dieses Produkt aus dem „Restkörper", der bei der Zerlegung von Erythroamylose durch α-Amylase (Pankreas) übrig bleibt, durch Fraktionirung mit Alkohol und Aceton, in einer Ausbeute von 7—11 %. Kristallisirt in tafeligen Aggregaten. F. (u. Z.) 258—263°, $[\alpha]_D = +183°$. Mol. G. (990) und Reduktion entsprechen einer Kette von 6 Glucosen. Keine Jodreaktion. Dasselbe Produkt entsteht aus der natürlich vorkommenden Erythroamylose aus dem Klebreis (*Oryza glutinosa*).

Dagegen ist das zweite definirte Dextrin, das 18-Dextrin KÖHLERS **136)**, ein Erythrodextrin; es besteht aus 18 Glucosen; daneben findet sich im Kristallisat anscheinend noch ein 12-Dextrin.

---

135) ***P. Klason, K. Sjöberg,*** Amylose-oktadextrin. Ber. Chem. Ges., **59,** 40 (1926). — 136) ***L. Köhler-Hollander,*** Kristallis. Erythrodextrin. Zs. phys. Chem., **228,** 249 (1934).

Es wird kristallinisch erhalten aus Amylo-amylose durch Speichelamylase bis zur rotvioletten Jodfärbung, 16 % Maltosewert, konz. im Vakuum. Stark reducirend. $[\alpha]_D = +170°$, geschmacklos. Unlöslich in kaltem Wasser und Alkali; in heissem Wasser löst es sich erst unter Opalisiren, dann Klarwerden. Wird leicht durch alle Amylasen gespalten. Die Kristalle bestehen aber noch aus drei Anteilen, einem von 24 Glucosen, einem konstant bleibenden von 18, und einem am leichtesten löslichen von 12.

Ein ähnlich halbwegs einheitliches Erythrodextrin erhielt SAMEC (l. c. 99) aus Erythroamylosen durch reine β-Amylase, in derselben Art wie VAN KLINKENBERG (l. c. 98) seine „Erythrogranulose" dargestellt hat. Während dieser sie aber für „Stärke" (α-Stärke) hält, da sie nicht reducirt, findet SAMEC schwache Reduktion, entsprechend einem Dextringemisch von 13—15 Glucosen, Molgew. ca 2000; vgl. a. § 379.

Achroodextrin, Grenzdextrin. Dagegen ist die alte Frage nach der Individualität des „Restkörpers" bei der Spaltung mit Malzdiastase (H.W. S. 654) immer noch nicht aufgehellt.

Es sei die Angabe LINTNER's **137)** wiederholt, daß dieses Grenzdextrin mit seinem alten Achroodextrin II identisch ist, und er ihm die Formel gibt $(C_6H_{10}O_5)_6 \cdot H_2O$; also ebenfalls einer Hexaose. Er erhielt es aus Kartoffelstärke mit Diastase-KAHLBAUM, Vergärung der Zucker und Reinigung mit Bleisubacetat, Tannin und Al-hydroxyd. $[\alpha]_D = +178{,}6$, Reduktion 22,9, Molgew. kryoskopisch 981 (ber. 990) Unempfindlich gegen alkoholgefällte Diastase-LINTNER, dagegen vergoren durch Diastase + Hefe (Komplementwirkung der Hefe, § 392). Taka ergab Glucose. Ein ganz analoges Produkt erhielten HOOP c.s. **138)** mit verschiedenen Malzsorten, Reinigung durch Umfällen aus Pyridin-Lösung. Ultrafiltrirbar, auch durch Säuren schwer angreifbar, resistent gegen käufliche Diastasen, aber zerlegt durch Malzextrakt nach PRINGSHEIM mit dem „Komplement"; Reduktion 12,78, $[\alpha]_D = +178{,}5$.

Dieses LINTNER'sche Grenzdextrin soll also 6 Glucosen umfassen und müßte in irgend einer Beziehung zur eben erwähnten Amylo-hexaose stehen; PRINGSHEIM (*l. c. 13*) hält es aber für einen Dreizucker-Körper, und eher für ein Trihexosan als einen Zucker, während andere wieder (aus Erythroamylose, resp. Glykogen) Trisaccharide isolirt haben (§ 368).

WEIDENHAGEN (l. c. 115) hingegen fand wieder wie PRINGSHEIM (l. c. 153) nach Vergärung der Maltose einen ziemlich einheitlichen Restkörper, der nicht reducirt (s. u.) PRINGSHEIM **139)** hält die Methode WEIDENHAGEN's für unzulässig; er kann garkein Grenzdextrin in Händen gehabt haben.

Hier bestehen also immer dieselben Unklarheiten weiter. Ebenso ist die Art seiner Entstehung noch nicht restlos geklärt. Übereinstimmend allerdings ist nunmehr die Angabe. daß (im Allgemeinen, eine Ausnahme s. SJÖBERG (l. c. 113), der auch aus Amylose u. U. ein „Dihexosan" erhielt), nur das Amylopectin, mit anderen Worten die Erythro-amylose unvollkommen in Maltose übergeführt wird, wie dies zuerst klar und deutlich PRINGSHEIM verfochten hatte.

Aber dieser hat angegeben, daß jegliche Art Amylase auf Amylopectin etwa bei 70 % Maltosebildung zu wirken aufhört und den Restkörper hinterläßt, und daß nur ein von ihm entdecktes „Komplement" (§ 392) die Amylase zur endgiltigen Spaltung befähigt. Dagegen gibt WEIDENHAGEN (l. c. 115) an, daß der Restkörper durch Amylase weiter gespalten wird, daß aber die 224 fache Menge Enzym dazu gehört; das „Komplement" existirt nicht, wogegen wieder PRINGSHEIM **139)** protestirt (§ 392). Auch PRONIN **139a)** fand die Menge des Restkörpers abhängig von der Enzymmenge, so daß also auch völlige Verzuckerung eintreten

137) ***C. J. Lintner, M. Kirschner***, Beim diastat. Abbau der Stärke entsteh. Grenzdextrin. Zs. Ang. Chem. **1923**, 119. — 138) ***L. de Hoop, J. A. van Laer***, Diastat. Stärkeabbau. Bioch. Zs., **155**, 235 (1925). — 139) ***H. Pringsheim, H. Borchardt, H. Hupfer***, Z. K. der Stärke. Zs. V. D. Zuck., **81**, 633 (1931). S.A. — 139a) ***S. Pronin***, Grenzabbau der Stärke durch Malzamylase. Bioch. Zs., **249**, 7, (1932).

kann. SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 125) geben auch ausdrücklich an, daß β-Amylase (Malz) die Erythro-amylose total in Maltose überführt, und daß nur bei nicht allzugroßer Enzymmenge hier zwischen 40 und 50 % Verzuckerung eine starke Verlangsamung des Abbaus eintritt; so entstehen also zwar anscheinend schwerer spaltbare Zwischenprodukte, aber keine unspaltbaren, und ein „Komplement" ist nicht notwendig. Nur α-Amylase (Pankreas) stellt ihre Wirkung bei maximal 70 % Verzuckerung ein. Der dann verbleibende Restkörper wird aber wiederum durch β-Amylase vollständig zerlegt.

Es gibt also jedenfalls eine Stufe des Abbaus, die gegen eine der amylatischen Wirkungen resistent ist, durch eine andere weiter zu Maltose abgebaut wird. Ob das „Komplement" insofern existirt, als es eben (wie übrigens auch PRINGSHEIM gelegentlich fand) in der Malzamylase ebenfalls vorhanden ist; oder ob es garnicht existirt und die Hemmung bei Malzamylase in den PRINGSHEIM'schen Versuchen anders zu erklären ist, ist für diese Frage zunächst ohne Belang: die Hauptsache ist, daß überhaupt eine amylasefeste Phase aus Erythro-amylosen entsteht und der Aufklärung harrt. PRINGSHEIM **140)** hat diesen „Restkörper" mit seinem und PICTET's Trihexosan identificirt, und diese Behauptung steht und fällt mit der Frage, ob dieses Trihexosan überhaupt als reiner chemischer Stoff mit niederer Molgröße existirt, und mit der weiteren, ob es vorstellbar ist, daß beim enzymatischen, also hydrolytischen Abbau, überhaupt ein solcher Anhydro-Körper auftritt. Dies ist heute noch so unklar wie damals.

PRINGSHEIM (l. c. 8 S. 248) hilft sich damit, daß er bei der Zerlegung der größeren Ketten wieder eine Ringschließung am reducirten Ende annimmt, aber das ist nur eine andere Form der Beschreibung seines Trihexosans, das ja eben diese Ringschließung voraussetzt. Es ist aber noch nicht einmal klar, ob dieser Restkörper überhaupt reducirt, danach müßte es sich um ganz verschiedene Gebilde handeln. PRINGSHEIM's Grenzdextrin reducirte nur schwach, das von WEIDENHAGEN (l. c. 115) garnicht. Ebenso will SYNIEWSKI **141)** mit Am. aus Gerste ein völlig reduktionsfreies Grenzdextrin erhalten haben, dessen Existenz er für seine alte Stärketheorie (1902, vgl. H.W. *l. c. 21*) ausnützt, die heute keine Rolle mehr spielt; nach POLACK **142)** ist aber dieses nicht reducirende Restprodukt nichts anderes als Amylopectin; dagegen fand LINK **143)** in Keimpflanzen von Mais ein natürliches nicht reduc. Achroodextrin, das er mit dem Trihexosan identificirt. Inzwischen haben nun aber aus dieser Phase WALDSCHMIDT-LEITZ die Amylohexaose, SAMEC (l. c. 120) ein noch nicht näher definirtes Trisaccharid isolirt. Dazu sei daran erinnert, daß nach LINTNER **137)** das Grenzdextrin ziemlich stark reducirt (22,9 % der Maltose), ebenso wie übrigens das alte Grenzdextrin II SYNIEWSKI's, das sich aus Amylose bilden soll.

Es ist also viel wahrscheinlicher, daß dieses Grenzdextrin nichts anderes ist als ein Gemisch höherer aber noch stark reducirender Zucker, wie der Amylo-hexaose, mit nicht mehr erheblich reducirenden höheren Kettenstücken.

Ungefähr dasselbe gilt für das, was LING und NANJI **144)** nunmehr Maltodextrin nennen, womit sie einen alten völlig unklaren Begriff zu neuem Leben erwecken wollen (H. W. S. 654). Es ist ein „Restdextrin", das aus ihrer α, β-Hexa-amylose, einem Spaltproduct des Amylopectins, entsteht (H. W. S. 663). In dieser sind 4 α- und 2 β-Bindungen (Isomaltose) vorhanden. Sie soll nun zerfallen in eine Maltose und das Restdextrin, das also noch 4 Glucosen enthält; es gibt mit Maltase „Isomaltose", mit Emulsin Maltose + Glucose. Das Restdextrin ist nun β-Maltodextrin, ein α-Maltodextrin soll aus der α, β-Hexaamylose durch einfache Aufspaltung einer β-Bindung entstehen, so daß bei gleichbleibendem C-gehalt Reduktion auftritt; es gibt bei Aufspaltung einer weiteren β-Bindung die β-Glucosido-maltose (§ 368). Wie deren Existenz, ist auch diese ganze Theorie sehr zweifelhaft (H. W. S. 649).

---

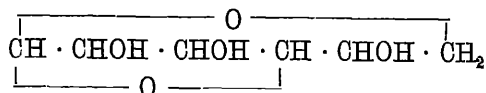
140) ***H. Pringsheim,*** Konst. der Stärke. Ber. Chem. Ges., **57,** 1581 (1924). S.A. — 141) ***V. Syniewski,*** Nicht reduc. Grenzdextrin. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **441,** 285 (1925). — 142) ***F. Polack, A. Tychowski,*** Chemie der Stärke etc. Bioch. Zs., **214,** 216 (1929). — 143) ***K. P. Link,*** Isol. of a dextrin etc. Jl. Amer. Chem. Soc., **51,** 2516 (1929). — 144) ***A. R. Ling, D. R. Nanji,*** Nature of polymer. amyloses. Jl. of Chem. Soc., **1923,** 2666, **1925,** 636.

4) Hexosane und Polyamylosen.

§ 371. Hexosane und Polyamylosen sind Gebilde, die sich von reducirenden Zuckern dadurch ableiten, daß entweder aus Monosen selbst oder aus glykosidisch verbundenen Oligosen durch nochmaligen Austritt von Wasser die reducirende Gruppe verloren geht, so daß allen diesen Stoffen die Grundformel $(C_6H_{10}O_5)^{\times}$ zukommt. Das geschieht bei einfachen Monosen durch Ausbildung einer zweiten Sauerstoffbrücke vom C_1 zu einem anderen C-Atom, z. B. zu einem „Glucosan". Solche wurden eine Zeit lang als Baugruppen der Polyosen angesehen. So hatte BERGMANN **144a)** angenommen, daß Triacetyl-amylose in Phenol spontan in ein monomeres Acetylglucosan zerfällt, das bei Abspaltung des Acetyls wieder zu Amylose zurück associirt; ähnlich bei der Cellulose HESS (§ 364). Diese Glucosane haben jedoch heute diese Stellung als Baugruppen und damit jegliches Interesse für unsere Darstellung verloren.

Die höheren Hexosane sind sehr verschiedener Struktur; man kann sie nach PRINGSHEIM (l. c. 3, S. 8) gliedern in solche vom Amylose-typus und vom Anhydrose-typus. Im ersteren Fall tritt die C_1-Gruppe jedes Zuckers mit einem Hydroxyl des anderen Zuckers anhydrisch zusammen. Ist also bereits eine Biose normalen Typs vorhanden, etwa Maltose, so entsteht ein Maltose-anhydrid durch Eingriff der freien C_1-Gruppe in ein Hydroxyl des Glucosido-teils der Maltose. Bei dem Anhydro-typus dagegen schließt das noch freie C_1 eine neue Sauerstoffbrücke mit einem OH desselben Zuckers, so daß also das Hexosan aus einem wahren Zucker und einem Anhydrozucker besteht; so ist z. B. ein „Maltosan" gebaut.

Unter der sehr großen Anzahl solcher Gebilde interessiren uns nur sehr wenige, die beim Abbau der Polyosen vorkommen; sie gehören, soweit wir bisher wissen, sämtlich dem Amylosetypus an (vgl. die Tabelle bei PRINGSHEIM l. c. 3, S. 18). Höhere Hexosane vom Anhydro-typus sind nicht beobachtet. Außerdem spielen noch einige einfache Anhydride, wie das aus β-Glucose erhältliche **Laevoglucosan**

```
┌──────────── O ────────────┐
CH · CHOH · CHOH · CH · CHOH · CH2
└────── O ──────┘
```

eine indirekte Rolle für Konstitutionsfragen, z. B. die der β-Bindung in der Stärke (§ 366a). Das stark umstrittene Biosan und ein Trihexosan aus Cellulose werden wir § 413 noch erwähnen; hier handelt es sich um eine Gruppe von Hexosanen aus Stärke und die auf besonderem Wege daraus erhältlichen Polyamylosen.

Bei den Hexosanen handelt es sich um solche Anhydride, die u. U. beim normalen Abbau der Stärke entstehen, und zwar zieht sich als roter Faden durch das ganze Gebiet hindurch das Problem, daß beim Abbau der Amylose ein Dihexosan entstehen soll, aus Amylopektin ein Trihexosan.

PRINGSHEIM selbst, der sich ja hauptsächlich mit diesen Problemen beschäftigt hat, ebenso SJÖBERG (l. c. 113) und PICTET nehmen an, daß diese dargestellten Anhydride nicht in der Stärke vorgebildet sind, denn sie geben weder die Jodreaktion, noch associiren sie; das Dihexosan SJÖBERG's wird schwer durch Säure hydrolysirt etc. So stehen wir denn vor der Frage, warum sie sich beim diastatischen Abbau in wässeriger Lösung überhaupt bilden. FREUDENBERG **145)** hält es für durchaus möglich, daß solche

---

144a) ***M. Bergmann, E. Knehe,*** Individualgruppe der Amylose. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **452,** 141 (1927). S.A. — 145) ***K. Freudenberg, K. Friedrich, J. Bumann,*** Cellulose und Stärke. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG) **494,** 41 (1932). S.A.

Stücke mit anhydrischem Abschluß aus den Ketten herausgesprengt werden; aber damit ist noch nicht darüber gesagt, warum sie nur manchmal beim diastatischen Abbau entstehen. Sehr einfach ist ihre Entstehung durch Abbau ohne Hydrolyse, wie ihn besonders PICTET studirt hat, der ihn zu Hexa-, Tetra- und Trihexosanen geführt hat (*l. c. 56*, **146—151**)). Dagegen ist die Entstehung der Di- und Trihexosane PRINGSHEIM's durch komplementfreie Diastase weder enzymtypisch geklärt, noch chemisch in ihren Beziehungen zum „Grenzdextrin" resp. Achroodextrin (§ 369), insbesondere nicht die Verschiedenheit zwischen Amylose und Amylopectin in dieser Hinsicht, die mit der allgemeinen Unsicherheit darüber zusammenhängt, ob diese beiden Stoffe chemisch verschieden sind oder nicht (§ 372).

PICTET **146)** gelang durch Erhitzen von Stärke in Glycerol auf 200° eine Depolymerisirung, bei der sich nacheinander ein Hexahexosan und ein Trihexosan bilden, die er trennen konnte. Das erstere gibt eine tiefrote Jodreaktion, die beim Erhitzen verschwindet, beim Erkalten wiederkehrt. Amylase spaltet beide in 100 % Maltose, mit Acetylbromid gibt das Trihexosan Heptacetyl-maltose neben Glucose. — Emulsin spaltet das Trihexosan in ein Dihexosan + Glucose (§ 334). Daneben entsteht ein Tetrahexosan durch freiwillige Polymerisation. Drehwerte: Dihexosan + 132,2, Trih. 154,3, Tetrah. 162,6, Hexah. 173,2° **(147)**.

Das Dihexosan geht mit konz. HCl oder mit Amylase ebenfalls glatt in Maltose über, deren Anhydrid es ist. Bei langem Erhitzen tritt eine völlige Depolymerisirung zu einem Glucosan **(148)** ein, und zwar einem 1,2 Glycerinaether des α-Glucosans. Laevoglucosan entsteht nicht, was PICTET sehr merkwürdig vorkommt (s. u.). Aus den ansteigenden Drehwerten von Di- bis Hexahexosan und löslicher Stärke schließt PICTET **147)** auf eine Kette in der Stärke von 3 Hexahexosanen = 18 Glucosen (Molg. 2916), was der HAWORTH'schen Berechnung der Kettenlänge sehr nahe kommt, aber doch in Anbetracht dessen etwas zu niedrig erscheint, daß KÖHLER (l. c. 136) ein echtes Dextrin mit 18 C isolirt hat.

PRINGSHEIM **152)** erhielt nun ein ganz ähnliches oder identisches Trihexosan aus Amylopectin, ein Dihexosan aus Amylose durch Acetylierung (H.W. S. 659). Mit dem Trihexosan identisch ist das aus Amylopectin durch Amylase bei mangelndem Komplement entstehende „Grenzdextrin" **(153)**. Später gab SJÖBERG **154)** an, daß auch Amylose durch Enzymspaltung bei starkem Komplementmangel das Dihexosan liefert, und daß dies — neben Amylobiose — auch aus Stärke durch *Sacchar. Saké* entsteht (l. c. 113). PRINGSHEIM erhielt dasselbe Trihexosan auch durch Glycerolspaltung von Glykogen **(155)**; Isolichenin ergab das Dihexosan **(155)**. Dagegen ist das Dihexosan von dem deutlich verschieden, das PICTET **147)** aus dem Trihexosan durch „Emulsin" erhielt; es dreht 20° niedriger.

Zu dieser bis auf das eine Dihexosan gemeinsamen Reihe von Hexosanen PRINGSHEIM's und PICTET's hat nun letzterer (l. c. 104) eine neue Reihe hinzugefügt, die **Isohexosane**. Sie sollen insofern viel stärkeähnlicher sein, als sie das bei den bisherigen Hexosanen vermisste Postulat erfüllen, daß sie erstens eine der Stärke analoge Jod-

146) ***A. Pictet, P. Stricker,*** Hexahexosane retirée de l'amidon. Helv. Chim. Acta, **7**, 932 (1924). — 147) ***A. Pictet, R. Salzmann,*** Sur la trihexosane. — Sur la dihexosane et la tetrahex. ebd., **7**, 934, **8**, 948. — 148) ***P. Castan, A. Pictet,*** Sur l'hexahexosane et la trihex. ebd., **8**, 946 (1925). — 149) ***A. Pictet,*** Sur le poids moléc. de l'amidon. Helv. Chim. Acta, **9**, 33 (1926). — 150) ***A. Pictet, R. Salzmann,*** Dépolymer. compl. de l'amidon. Helv. Chim. Acta, **10**, 276 (1927). — 151) ***A. Pictet, H. Vogel,*** Sur une nouv. série des prod. de dépolymér. de l'amidon. ebd., **12**, 700 (1929). — 152) ***H. Pringsheim, K. Wolfsohn,*** Aufbau der beiden Stärkebestandt. Ber. Chem. Ges., **57**, 887 (1924). S.A. — 153) ***H. Pringsheim, A. Beiser,*** Kompl. der Amyl. III. Bioch. Zs., **148**, 336 (1924). — 154) ***K. Sjöberg,*** Enzym. Spalt. der Stärke. Ber. Chem. Ges., **57**, 1251 (1924). — 155) ***H. Pringsheim,*** Konstit. der Stärke. Ber. Chem. Ges., **57**, 1581 (1924). S.A.

Abgeschlossen: 15. 11. 35. Ber. Phys. 88, H. 5/6.

reaktion geben (Dihexosan in Wasser blau, Trihexosan rot), und daß sie in wäßriger Lösung spontan zu Gebilden associiren, die der genuinen Amylose gleichen. PICTET denkt also daran, daß diese Hexosane wirklich direkt und nicht umgeformt aus den Stärkeketten beim anhydrischen Abbau herausgeschlagen, wahrhafte Strukturelemente sind.

PRINGSHEIM (l. c. 3, S. 201) lehnt dies ab, da die optischen Werte nicht stimmen; sie sollen also wie die anderen Hexosane keine Bau-Elemente sein. Da die Drehwerte fast dieselben sind, wie für die erste Reihe, und PICTET gerade durch Extrapoliren aus diesen Zahlen der Drehwerte zu einer Mol. Gew.-Angabe der Stärke kam (l. c. 149), so ist dieser Zweifel als einziger Einwand nicht verständlich. Das Argument gegen die anderen war ja wie gesagt das Ausbleiben der Jodreaktion und der Association.

PICTET erhitzte Stärke mit wenig Glycerol auf 220° (5 h). Dabei entsteht als Hauptprodukt das Trihexosan, das sich isoliren läßt. Kalte HCl spaltet zu einer (neuen) Hexotriose auf, dagegen gibt Malzdiastase oder verd. Oxalsäure neben Glucose die Dextrinose (§ 368). Setzt man die Glycerolerhitzung der Stärke fort, oder erhitzt man das Trihexosan selbst mit Glycerol auf 240°, so geht es in ein neues Iso-dihexosan über, das Dextrinosan, das nun mit kalter HCl wieder Dextrinose liefert. Das Trihexosan geht in seiner konz. wäßrigen Lösung bei niederer Temperatur spontan in ein Poly-hexosan über, das äußerlich, durch Jodreaktion etc. der Amylose gleicht, aber schon durch heisses Wasser wieder depolymerisirt wird. Es scheint bei der Acetylirung — wahrscheinlich unter teilweiser Depolymerisirung — ein Associat aus 12 Glucosen zu geben. — Bei der künstlichen Anhydrisirung von Dextrinose entsteht ein anderes Dihexosan, das leicht durch Wasser aufgespalten wird, also FEHLING'sche Lösung reducirt, wahrscheinlich einen Aethen-ring enthält. — Auch diese Hexosane gehen nach KARRER 156) mit Acetylbromid restlos in Maltose über.

PRINGSHEIM 157) hat weiterhin nach verschiedenen Methoden noch ein dem genuinen Glykogen sehr ähnliches Desaggregations-produkt erhalten, das er **Glykogesan** nennt, und das sich sehr merkwürdig verhält. Zuerst erhielt er es durch Kochen von Glykogen-acetat in Chloroform, mit Benzol-sulfosäure als Katalysator, und Abspaltung des Acetyls. Es gleicht dem Glykogen selbst in Drehung, Jodreaktion und enzymtypischem Verhalten. Amylase spaltet in derselben Geschwindigkeit zu Maltose, Muskelsaft führt in Milchsäure über. Dasselbe Produkt aber entsteht anscheinend aus Glykogen in geschmolzenem Acetamid (158). Es ist in Wasser ohne Opalescenz löslich, Jodfarbe des Glykogens. Seine Molgröße scheint ganz von dem Zustand im betr. Lösungsmittel abzuhängen. In Acetamid zeigt es ebenso wie das Acetat eine Molgröße von $1 \times C_6$, in Wasser dagegen zunächst $3 \times C_6$. Dann geht es aber sowohl in Lösung wie im festen Zustand sehr schnell wieder in kolloides Glykogen über. — Ein ebenfalls spontan associirendes Diamylan (zuerst Amylosan genannt) gewann in analoger Weise STEINGROEVER 159) durch Desaggregirung aus Amylose-Acetat. Es gibt blaue Jodreaktion, ist in Wasser zuerst nieder-molecular (< 600), geht dann aber in ein hochmolekulares, der Amylose ähnliches Produkt über.

Eine andere Depolymerisirung der Stärke hat HELFERICH 160) durch wasserfreies HF erreicht. Es entsteht dabei ein Amylan von unbekannter Molgröße. Dasselbe scheint sich als Reversionsprodukt zu bilden, wenn man Maltose mit HCl behandelt.

Auf die rein synthetisch von PICTET — aus Laevoglucosan durch Erhitzen mit $ZnCl_2$ — hergestellte Reihe der Polyglucosane (2—4, 6—8) sei hier nur hingewiesen, da sie wieder eine andere Struktur haben, als die Hexosane aus Stärke. IRVINE 161) hat mit Hilfe der Methylirung für das Di- und Triglucosan Formeln wahrscheinlich gemacht.

---

156) ***P. Karrer, E. v. Krauss***, Erhitzen von Polysacchariden in Glycerin. Helv. Chim. Acta, **13**, 1071 (1930). — 157) ***H. Pringsheim, G. Will***, Konstit. des Glykogens. Ber. Chem. Ges., **61**, 2011 (1928). S.A. — 158) ***J. Reilly, H. Pringsheim, P. P. O'Donovan***, Glykogen. ebd., **63**, 1093, 2631, 3210 (1930). — 159) ***A. Steingroever***, Amylose und Amylopektin. Ber. Chem. Ges., **62**, 1352 (1929). S.A. — 160) ***B. Helferich, A. Stärker, O. Peters***, Einw. von HF auf Stärke. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **482**, 183 (1930). — 161) ***J. C. Irvine, J. W. H. Oldham***, Polymer. of β-glucosan. Jl. of Chem. Soc., **127**, 2903 (1925).

Die allgemein wichtige Ausbeute aus der Erforschung aller dieser Stoffe ist noch ebenso mager wie im Hauptwerk; es sind eher noch mehr Unklarheiten hinzugekommen. Von keinem einzigen dieser Hexosane ist die absolute Individualität eines chemischen Stoffes gesichert, es kann sich immer wieder — genau wie bei den daraus durch Aufspaltung einer Anhydridbindung entstehenden Biosen und Trisacchariden — um Gemische von verschiedenen Kettenbruchstücken, oder um Reversionen noch einfacherer Zucker handeln.

Tatsächlich werden alle diese Ergebnisse nicht nur in Einzelheiten, sondern prinzipiell angefochten. Nach KARRER (l. c. 156) sind hydrolytische Vorgänge nicht auszuschließen; er hält alle diese Stoffe für Kettenbruchstücke, deren Molgröße wesentlich die von den Autoren angenommene übertrifft. Auch SAMEC **162)** hält die PICTET'schen Hexosane nach osmometrischen und Diffusionsbestimmungen für hochmolekular (> 1000); die kryoskop. Molgewichte beruhen auf Verunreinigungen. Dagegen sind die durch Chloroform oder kalte HCl erhaltenen Produkte wirklich 2—4 fach Glucose, die Naphtalinprodukte dagegen > 1300. Mit größter Schärfe geht BERNER **163)** gegen die ganze Lehre vor: nach seiner Meinung sind sämtliche PICTET'schen Hexosane, die durch Depolymerisation mit Glycerol und Nachbehandlung mit Alkohol dargestellt sind, nichts weiter als Gemische resp. Verbindungen ganz hochmolekularer Stoffe mit Glycerol und Alkohol; er fand bis zu 5 % Alkohol und 12 % Glycerol, auf die er in der Hauptsache die Gefrierpunktserniedrigung zurückführt. Unter anderen Bedingungen (40 h Erhitzen auf 180°, bei Gegenwart von Phosphorsäure 130°) führt dagegen die Zerteilung durch Glycerol zu völligem Abbau, wobei Glycerol-glucosid entsteht, ebenso durch Glykol α- und β-Glykol-glucosid; auch Phenol und Benzylalkohol wirken analog **(164)**; methylirte Stärke in Methanol ergibt 2, 3, 6 Trimethyl-methylglucosid ($\alpha + \beta$). Ganz ebenso verhält sich Glykogen: mit Glycerol bei 160° entsteht ein Gemisch von α- und β-Glycerol-glucosid; mit PhS als Katalysator schon bei 130°, auch Glykol wirkt analog **(164a)**.

Und wenn wir selbst eines oder das andere, etwa das nun gemeinsame PRINGSHEIM-PICTET'sche Trihexosan, als einheitlich und rein ansehen, so steht noch nichts über die feinere Struktur fest. Wenn man etwas feststellen kann, so ist es die allmähliche Abwendung von den viel berufenen „β-Bindungen". Die Stoffe scheinen tatsächlich eher alloiomorphe Hexosen zu enthalten, die sich erst bei der strukturellen Umwandlung in echte pyroide β-Bindungen umlagern können. Vor allem sollte man einmal relativ reine β-Glucosidasen einwirken lassen, nachdem die Angaben über die Wirkung von „Emulsin" so verschieden lauten. Und endlich ist durchaus noch nicht aufgeklärt, ob wirklich dieselben Stoffe primär beim Stärkeabbau entstehen, und ob das Trihexosan wirklich nur aus dem Amylopectin resp. Glykogen entsteht; ferner nicht aufgeklärt, wie der Übergang in Maltose vor sich geht, und was der Komplementmangel bedeutet. Ehe nicht diese vielen und schwierigen Vorfragen bereinigt sind, wird sich die Bedeutung dieser Hexosane für den Stärkebau auch nicht sicher aufklären lassen.

Andererseits wäre wenigstens bei einigen von ihnen die Sicherstellung der genauen Struktur, besonders der glucosidischen Konfiguration und der Lage der O-Brücken für die Stärkefrage von großer Bedeutung. Es sind dies, wie SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 125) betonen, die wenigen, die eine Jodreaktion geben, nämlich die blau-

---

162) ***M. Samec,*** Mittl. Teilchengrösse einiger Stärkesubst. etc. Koll. Chem. Beih., **37,** 91 (1932). — 163) ***E. Berner,*** Vermeintl. Depolymer. des Glykogens. Ber. Chem. Ges., **63,** 2760 (1930). S.A. — 163a) ***E. Berner, R. Petersen,*** Sogen. Hexosane aus Stärke. Ber. Chem. Ges., **65,** 687 (1932). S.A. — 164) ***E. Berner, F. Melhus,*** Alkohol. Abbau der Stärke. Ber. Chem. Ges., **66,** 1333 (1933). S.A. — 164a) ***E. Berner, O. G. Dahl,*** Thermal degrad. of glycogen. Norske Vid. Selskab Förh., **6,** H. 34 (1933). S.A.

färbenden: PRINGHEIM's Diamylan und PICTET's Iso-dihexosan, und das rotfärbende Iso-trihexosan. Denn das Verbleiben der einen oder anderen Jodreaktion ist ein Zeichen verschiedener Struktur; und wenn man also bei einem niedermolekularen Stoff diese Struktur ergründen konnte, so hätte man das Modell für die betr. Anteile der Stärke selbst. Dasselbe gilt für die Frage, welche Gruppirung für die Neigung zur kolloidalen „Ballung" verantwortlich ist. In diesem Sinne ist also die Rolle der „Hexosane" für die Aufklärung der Stärkestruktur noch nicht ausgespielt.

Über die **Polyamylosen** ist eigentlich alles Wesentliche bereits im H.W. S. 656 berichtet worden. Diese „Kristallisirten Dextrine", die SCHARDINGER aus Stärke durch den *Bac. macerans* erhielt, und die dann PRINGSHEIM genau untersucht hat, sind an sich sehr interessante Stoffe und erlauben es, gewisse Möglichkeiten der Verknüpfung von Glucose-Bausteinen und Umwandlungen dieser Verknüpfungen, Associationen etc. an reinen einheitlichen Körpern zu erforschen, aber damit ist ihre Bedeutung erschöpft. Als Baugruppen der Stärke kommen sie nach PRINGSHEIM nicht in Frage. Dies ist schon damit auszuschließen, daß alle diese Gebilde sowohl gegen alle Arten von Amylase resistent sind, wie auch gegen α- und β-Glucosidasen (*l. c. 44*). Sie bilden auch in Algen keine Stärke, bei der Durchströmung der Leber kein Glykogen, steigern im Muskel die Milchsäurebildung nicht (*l. c. 75—77*), und werden vom Diabetiker zwar oxydirt, aber anscheinend ohne daß Glucose intermediär entsteht **(165)**; vielleicht sind sie aber in gewisser Hinsicht Modelle für den Bau der Stärke (l. c. 185).

So sei hier nur kurz wiederholt, daß es nach PRINGSHEIM zwei Reihen von Polyamylosen gibt, eine α- und eine β-Reihe, die sich durch ihre Drehwerte und ihre Jodprodukte unterscheiden. In der α-Reihe gibt es drei Stoffe: Diamylose $(C_6H_{10}O_5)_2$, ihr bimeres Produkt Tetraamylose und ihr trimeres Produkt Hexa-amylose. In der β-Reihe gibt es nur die Hexa-amylose, die nach PRINGSHEIM eine bimere Triamylose $(C_6H_{10}O_5)_3$ ist, während sie KARRER für ebenfalls eine trimere Diamylose hielt, und die Identität der PRINGSHEIM'schen Triamylose mit seiner Hexa-amylose behauptete (*l. c. 50—54*).

Auffallend ist die Angabe von LEIBOWITZ **166)**, daß diese scheinbar so ganz „unphysiologischen" Stoffe, die gegen die üblichen Enzyme wie erwähnt resistent sind, doch einer Enzymwirkung unterliegen: sie werden von Taka (*Aspergillus oryzae*) zu Glucose aufgespalten; ph-Optimum bei 4,5.

Durch Adsorption an Kaolin erhält man eine Amylase + Maltase, die nicht mehr auf Polyamylosen wirkt, umgekehrt gelingt durch β-$Al(OH)_3$ bisweilen die Gewinnung des reinen Polyamylosen spaltenden Ferments, aber nicht regelmäßig. — Maltose tritt bei der Spaltung nicht auf. Die Geschwindigkeit der Spaltung ist unabhängig vom Polymerisationsgrad, dagegen scheinen für α- und β-Polyamylosen zwei verschiedene Enzyme zu bestehen: die β-Reihe wird viel schneller und quantitativ gespalten, α nur unvollkommen, da die Spaltprodukte hemmen. Da die relative Wirkung auf α und β von Präparat zu Präparat wechselt, liegen vielleicht zwei Fermente vor. FREUDENBERG (l. c. 185) gibt kurz an, daß Taka tatsächlich, aber „sehr unvollkommen" wirksam ist.

Da die Existenz einer eigenen Triamylose für PRINGSHEIM's gesamte Theorie der Stärke insofern wichtig war, als sie hauptsächlich aus dem Amylopectin, resp. Glykogen entstehen sollte — wie die ganze β-Reihe —, und somit eine Stütze war für seine überall verfochtene Anschauung, daß dem Amylopectin ein Drei-Glucose-Kern zu grunde liegt, der sich auch im Trihexosan und der Amylotriose manifestirt, so hat er diese Frage intensiv weiter bearbeitet und hält (l. c. 3, S. 262) die β-Triamylose für gesichert **(167)**. Sie unterscheidet sich von der-

165) ***H. v. Hoesslin, H. Pringsheim,*** Ernähr. von Diabetikern mit Polyamylosen. Münch. Med. Ws. **1927,** 95. — 166) ***J. Leibowitz, P. Mechlinski,*** Ferm. Spalt. der Polyamylosen. Ber. Chem. Ges., **59,** 2738 (1926). S.A. — 167) ***H. Pringsheim, J. Leibowitz,*** Molek. Grösse und Assoc. der Polyamyl. Ber. Chem. Ges., **59,** 2058 (1926). S.A.

β-Hexa-amylose durch Löslichkeit in Wasser (**168**), spec. Drehung (**169**), Mol. Gew.-Bestimmungen (direkt (**167**), sowie an Nitraten (**168**) und Methyläthern), Kristallformen (**170**) der Methyloderivate, Bromgehalt der Brom-Additionsprodukte (**171**), Geschmack (**169**). SAMEC **172**) hat dies bestätigt, er fand den osmotischen Druck wie den Diffusionskoefficienten verschieden; danach hat die Triamylose ein Mol.-Gew. von 486 ± 35, die Hexaamylose von 900—1000. Immerhin erkennt PRINGSHEIM an, daß in der β-Reihe die Tri- und Hexa-amylose einander viel näher stehen, als die 3 Vertreter der α-Reihe, denn letztere haben verschiedene Kristallstruktur und verschiedene Verbrennungswärme, die α-Hexaamylose hat eine viel höhere Verbr. W. als die Diamylose (Tabelle l. c. 3, S. 265). Die α-Diamylose geht trotzdem unter Überspringung der Tetraamylose in die α-Hexa-amylose über (**167**), wenn man die trocknen Kristalle mit Wasser befeuchtet; es geht diese Umwandlung bis zu einem Gleichgewicht vor sich, das von der Konz. abhängt. Dagegen geht sie beim Umkristallisiren in Wasser in Tetra-amylose über, bleibt aber beim Umkristallisiren in verd. Alkohol als Diamylose erhalten.

Dieser Befund ist wichtig für die Streitfrage, ob die Diamylose als chemischer Stoff überhaupt existirt. MIEKELEY **173**) hatte beim Verseifen der Acetate und Umkristallisiren in Wasser immer nur Tetraamylose erhalten, ebenso gibt ULMANN **180—182**) an, daß sämtliche 6 röntgenographisch verschiedenen Modifikationen der α-Amylose die Tetra-Stufe darstellen: osmotische Bestimmungen zeigten, daß die Molgröße vom ph abhängt und bei alkalischer Reaktion eine Diamylose entsteht, bei saurer dagegen Stufen von 8—16 Glucosen. Beim Auskristallisiren entsteht aber immer Tetraamylose. Dies haben also PRINGSHEIM c.s. **169**) bestätigt, aber gleichzeitig gezeigt, daß geringe Mengen Alkohol (2—4 % (**176**)) durch Ausbildung einer Molekülverbindung (**178**) die Diamylose beständig machen, womit sich die Einwände erledigen.

Nach KATZ **179**) sind Di- und Tetraamylose im Röntgendiagramm nicht zu unterscheiden; das Diagramm ist sehr ähnlich dem Verkleisterungsspektrum (V) der nativen Stärke und einiger verwandter Stoffe. Da KARRER (*H.W. l. c. 51*) diese Diamylose als Maltose anspricht, so ist diese Identität für die Frage der Maltose-Struktur der Stärke von Interesse, umsomehr als auch FREUDENBERG (s. u.) die Poly-amylosen sozusagen als verkleinerte Modelle der Stärke mit gleichem Kettenabschluß ansieht.

Es ist also der Stärkeabbau so zu deuten, daß aus Stärke zuerst die Diamylose entsteht, die in geringem Maße in Hexa-, beim Auskristallisiren in Tetra-amylose übergeht. Auch Übergänge von der α- in die β-Reihe sind beobachtet, so durch Erhitzen in Glycerol; ferner bei der Bildung von Amylobiose (§ 368) durch kalte HCl aus Tetra-amylose (**174**).

Besonders interessant ist die leichte Association der Polyamylosen; sie gehen schon in heißem Wasser in kolloide Aggregate über, die keine Erhöhung des Kp. mehr bewirken (*l. c. 46, 48*). In organischen Lösungsmitteln zeigen sie je nach ihrer Art und je nach dem Lösungsmittel ganz verschiedene Ballungszustände, z. B. ist Diamylose-acetat in Eisessig monomolekular, in Benzol kolloidal (**175**). Das Acetat der Tetra-am. behält in Benzol seine Molgröße, wird aber in Phenol und Eisessig zur Diamylose aufgeteilt (**176**), Hexa-amylose nur in Phenol, in Eisessig u.a. nicht.

Andrerseits zeigen sie Zerfallserscheinungen: sie gehen durch bestimmte Eingriffe in Stoffe vom Molgewicht einer Glucose über (in Wasser). PRINGSHEIM c.s. **177, 178**) haben mehrere

---

168) ***J. Leibowitz, S. H. Silmann***, Salpetersäureester der Polyamyl. ebd., **58**, 1889 (1925). — 169) ***H. Pringsheim, A. Weidinger, H. Sallentin***, Diamylose etc. ebd., **64**, 2117 (1931). S.A. — 170) ***H. Pringsheim***, Flechtenstärke. Zs. phys. Chem., **144**, 241 (1925). — 171) ***H. Pringsheim, A. Steingroever***, Halogenverb. der Polyamylosen. Ber. Chem. Ges., **57**, 1579 (1924). — 172) ***M. Samec***, Kolloidchemie der Stärke, Leipzig 1927, S. 54. — 173) ***A. Miekeley***, Fragl. Exist. der sog. α-Diamylose. Ber. Chem. Ges., **63**, 1957 (1930). — 174) ***H. Pringsheim, A. Steingroever***, Amylobiose. Ber. Chem. Ges., **59**, 1001 (1926). S.A. — 175) ***H. Pringsheim, P. Meyersohn***, Dispergir. der Polyamylosen. ebd., **60**, 1709 (1927) S.A. — 176) ***H. Pringsheim, A. Beiser***, Diamylose und Tetra-amylose. ebd., **65**, 1870 (1932). — 177) ***H. Pringsheim, A. Wiener, A. Weidinger***, Neue Polyamylosen I. Ber. Chem. Ges., **63**, 2628 (1930). S.A. — 178) ***H. Pringsheim, A. Weidinger, P. Ohlmeyer***, Neue Polyamylosen II. ebd., **64**, 2125 (1931). S.A.

solcher Körper dargestellt, so aus Tetraamylose durch Auflösen in Formamid und Fällen mit Alkohol, wobei zu 80 % ein α-Amylosan und zu 20 % ein β-Amylosan entstehen; beides kristallisirte Stoffe mit bestimmten Reaktionen, z.B. mit Jod α grün, β braun (Tabelle l. c. 3, S. 274). Beim Erhitzen der wässer. Lösung gehen sie in die entsprech. Isoamylosane über, die nun wieder die Neigung zur Aggregation zeigen, wie sie die von PRINGSHEIM hergestellten Zerfallsprodukte aus Stärke, Glykogen etc. auch zeigen, so daß hier ein künstlicher Aufbau von kolloiden Polysacchariden gelungen zu sein scheint. Eine dritte Reihe entsteht beim Erhitzen von Tetra-bezw. β-Hexaamylose in Formamid, die Allo-amylosane, von denen α wieder monomer ist, während bei β wegen der Schwerlöslichkeit die Molgröße nicht bestimmt werden konnte. Auch diese Stoffe sind nur gegen Taka empfindlich ($\beta > \alpha$); sonst fermentresistent. Interessant ist, daß das monomere α-Amylosan mit Acetylbromid wieder nur Maltose ergibt, so daß diese hier nur synthetisch entstanden sein kann.

Auch REILLY **183)** erhielt aus ganz trockener Tetra-Amylose in Acetamid und Formamid ein Produkt mit dem Molgewicht eines Monohexosans. Über die Struktur dieser sehr sonderbaren Stoffe ist leider nichts bekannt.

Die Konstitution der Polyamylosen ist noch nicht geklärt. Bei der Methylirung gibt die β-Hexa-amylose wie alle anderen stärkeähnlichen Stoffe ausschließlich 2, 3, 6-Trimethyl-glucopyranose. α-Tetraamylose läßt sich nicht voll methyliren (IRVINE c.s. **184)**); es sind nur drei der vier Glucosane zu methyliren, so daß im ganzen 11 Methyle eintreten; die Spaltung liefert 2, 3, 6 Trimethylglucose und Dimethyl-glucose 3 : 1. Nach FREUDENBERG **185), 186)** haben sie am Ende der Kette eine leicht hydrolysirbare β-Bindung, eine Laevoglucosanbindung, wie sie wahrscheinlich die Stärke selbst auch hat.

Im übrigen unterzieht FREUDENBERG die ganze Lehre PRINGSHEIMS einer sehr scharfen Kritik. Alle die von PR. angegebenen Polyamylosen existiren nicht. Keine der isolirbaren Stufen hat weniger als 5 Glucose-gruppen. Dies folgt sowohl aus kryoskopischen Messungen in Camphenilon, wie aus Diffusionsversuchen nach BRINTZINGER, aus kinetischen und optischen Messungen. Sichergestellt sind bisher nur das α-Dextrin SCHARDINGERS mit 5 und das β mit 6 Glucosen. Daneben gibt es anscheinend noch γ, δ, ε, die aber noch nicht identificirt sind. Aus diesen sehr schwer trennbaren Gemischen mit $\beta > \alpha$ bestehen alle von PRINGSHEIM beschriebenen Einzelstoffe. Danach und nach ihrer Struktur mit Laevoglucosan-abschluß sind die Polyamylosen nichts anderes als verkürzte Stärkeketten mit mindestens noch 5 Glucosen. Diese Ergebnisse FREUDENBERGS verlangen eine Neuaufnahme der ganzen Frage nach dem enzymtypischen Verhalten der Polyamylosen. Denn wenn sich die absolute Resistenz gegen alle Arten von Amylase sowohl wie gegen alle Glucosidasen, wie auch die Unwirksamkeit im Tierkörper, dagegen die Spaltung durch Taka nach LEIBOWITZ (l. c. 166) bestätigen ließe, so wäre das ein Hinweis auf das Versagen der üblichen Amylasen bei kurzen Ketten mit erhaltener Stärkestruktur, während sie auf die kurzen Ketten ohne anhydrischen Schluß, wie auf Amylohexaose, wirksam sind (§ 368); und somit auf die Existenz eines besonderen Enzyms. Diese Frage ist also enzymtypisch von größtem Interesse.

---

179) ***J. R. Katz, J. C. Derksen,*** Rö-Spektrum der α-Diamylose. Zs. physikal. Chem. A., 158, 337. — 180) ***M. Ulmann, C. Trogus, K. Hess,*** α-Dextrin von F. SCHARDINGER. Ber. Chem. Ges., 65, 682 (1932). — 181) ***Dies.,*** Modifik. des α-Dextrins etc. Zs. physikal. Chem. B., 21, 1 (1933). — 182) ***M. Ulmann,*** Molekülgrösse des α-Dextrins etc. Bioch. Zs., **251,** 458 (1932). — 183) ***F. Reilly, P. P. O'Donovan, H. Murphy,*** Mol. komplex. of amylose etc. Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., 21, 37 (1934); BPh 79, 263. — 184) ***J. C. Irvine, H. Pringsheim, A. F. Skinner,*** Methyl. der α-Tetra-amylose. Ber. Chem. Ges., 62, 2372 (1929). S.A. — 185) ***K. Freudenberg,*** Chemie der Stärke etc. (Vortrag). Ang. Chemie 1934, 675. — 186) ***K. Freudenberg, R. Jacobi,*** SCHARDINGERS Dextrine. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **518,** 102 (1935).

5) Die natürlichen Stärkearten, Amylopectin und Glykogen.

§ 372. In den Problemen um die Natur der verschiedenen natürlich vorkommenden Stärkearten häufen sich naturgemäß noch einmal alle die ungelösten Fragen, die wir bisher erörtert haben: die Frage nach der Kettenlänge, damit zusammenhängend also, ob die Stärke ein Molekülkolloid oder ein Micellgebilde ist, die Frage nach den strukturellen Einheiten, die wieder die Unterfrage einschließt, ob es strukturverschiedene Stärkearten gibt, die Frage nach den Kettenenden, da die Stärke nicht reducirt etc.

Nach dem äußeren Verhalten, besonders der Schichtenbildung der Sphäro-Kristalle, der Temp. des Aufquellens, der Art der Verkleisterung etc. gibt es beinahe so viele Abarten der Stärke, wie es stärkehaltige Pflanzen gibt.

Damit können wir uns hier natürlich nicht beschäftigen. Wir können nur Einiges herausgreifen, was zu unserem engeren Thema: den Beziehungen des Stärkeaufbaues zur enzymatischen Hydrolyse gehört.

Über den micellaren und kolloid-chemischen Aufbau des Stärkekorns siehe die zusammenfassenden Anschauungen von van der Hoeve c.s. 187) die auch die Theorie der Verkleisterung umfassen. Dazu auch Gorbatschoff 188), der die Verkleisterung in nicht wässerigen Flüssigkeiten untersuchte und fand, daß diese Wirkung von der Dielectrizitätskonstante abhängt: die Temp. ist um so niedriger, je höher die Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeit. Die Wirkung der in Wasser gelösten Stoffe hängt davon ab, ob sie die Adsorption des Wassers an die Stärke erhöhen oder vermindern. Stoffe mit zu niedriger Di-El.-konstante zersetzen die Stärke vor der Verkleisterung.

Über Beobachtungen des Stärkeabbaues durch Amylase im Ultramikroskop s. Nagai 189). Es lassen sich distinkte Körnchen und eine Kittsubstanz unterscheiden, die zuerst gelöst wird, so daß aus der kompakten weissen Scheibe die Körnchen hervortreten, die dann langsam locker werden (Brown'sche Bewegung) und verschwinden. Weitere Beobachtungen an mit Jod gefärbter Stärke ebda.

Daß die native Stärke aus einer Art von Kristallen, und zwar geschichteten **Sphäro-Kristallen** besteht, ist längst angenommen worden, und exakt mit Hilfe von Röntgendiagrammen 1920 von Herzog und Jancke erwissen worden. Daneben kommen auch nadelförmige Kristalle vor, wie sie z. B. Bakhuyzen 190) durch Behandeln von Weizenstärke mit Alkohol oder Alsberg 191) durch Autoklaviren aus verschiedenen Kleistern erhalten hat. Es können aber auch die isolirten Anteile der Stärken, Amylose und Amylopectin, im Gegensatz zu vielfachen Annahmen betr. Amylose, in Form von Kristalliten auftreten, wie Katz c.s. 192) gezeigt haben, ebenfalls an Rö-Diagrammen.

Da die Frage dieser Kristallbildung eng zusammenhängt mit der seit langem erörterten Frage der „**Retrogradation**", so müssen wir mit wenigen Worten auf dieses bereits im H.W. S. 681 kurz erwähnte Problem zurückkommen. Ganz allgemein versteht man darunter das Entstehen einer „künstlichen Stärke" aus den kolloiden Lösungen resp. den Kleistern. Diese Ausflockung kann auf verschiedene Weise zustandekommen, durch Altern, sowie vor allem unter dem Einfluß von Malzextrakt, wobei

---

187) ***J. A. van der Hoeve, H. G. Bungenberg de Jong, H. R. Kruyt,*** Verkleisterung der Kartoffelstärke. Koll. Beih., **39,** 105 (1933). — 188) ***S. W. Gorbatschoff,*** Mechan. der Stärke-Verkleist. Bioch. Zs., **224,** 91 (1930). — 189) ***K. Nagai,*** Ultramicr. studies on the ferm. proc. of starch. Acta schol. Med. Kyoto, **7,** 569, 577 (1925); BPh **35,** 18. — 190) ***H. L. van de Sande-Bakhuyzen,*** Crystall. of starch. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **23,** 506 (1926). — 191) ***C. L. Alsberg, E. O. Griffing,*** Crystall. of starch. ebd., **23,** 728 (1926). — 192) ***J. R. Katz, Th. B. van Itallie,*** Rö-Spektren der beiden Stärkeanteile. Zs. physikal. Ch. **A, 155,** 199 (1931).

dann ein gegen diese Amylase ziemlich resistenter Niederschlag entsteht. Diesen Vorgang hat man mit einem besonderen Enzym **Amylokoagulase** zusammengebracht, was aber überflüssig erscheint; in Wirklichkeit beruht die Ausflockung auf einer Zerlegung der als Schutzkolloid wirksamen Amylose, so daß dann ein Niederschlag entsteht. Diese Ursachen der Retrogradation sind davon abgesehen hier ohne Belang, hier interessirt nur, daß sie mit einem Kristallisationsprozeß verbunden ist. Es treten dabei besondere Rö-Spektren auf. Wie KATZ **193)** nachweisen konnte, retrogradirt auch Amylopectin; nicht nur, wie meist angenommen, Amylose. Die Kristallbildung ist verbunden mit Verschiebungen von Wasser, so daß die retrogradirte Stärke anders gebaut sein kann, als die native. Es sei kurz erwähnt, daß die Retrogradation die Hauptursache des „Altbackenwerdens" des Brotes ist (KATZ **194)**); Änderungen des Rö-Spektrums und des Quellungsvermögens verlaufen symbat, ferner nimmt auch die Amylose ab.

Röntgen-diagramme. Wir haben bereits erwähnt, daß die bisherigen Ergebnisse nicht ausreichen, um ein Bild vom räumlichen Bau der Stärke zu geben (§ 266). Aber davon abgesehen haben die Diagramme doch schon sehr wesentliche Aufschlüse über die Natur der verschiedenen Stärke-abarten und ihre Zusammenhänge gegeben. Bei der nativen Stärke gibt es zwei ziemlich scharf getrennte Abarten (NÁRAY-SZABÓ **195), 196)**, KATZ c.s. **193)**). Man unterscheidet die Gruppe der Samenstärken (Reis- oder Weizengruppe) mit einem Diagramm A und eine Kartoffelgruppe mit dem Diagramm B. Nach KATZ bilden aber diese beiden Formen nur die Flügel einer verbindenden Reihe, es gibt allerlei Stärkeformen, die in der Mitte stehen, so von Knollenstärken *Marantha* und *Manihot,* von Früchten *Musa,* sowie der echte Sago, das Stammark von *Metroxylon.* Zur Kartoffelgruppe gehört noch die Knollenstärke von *Canna* und die Samenstärke von *Aesculum hippocastanum.* Diesen beiden Typen resp. ihren Zwischentypen (Diagr. C) entsprechen ebenso typische Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften der betr. Amylopectine (SAMEC und KLEMEN **197), 198)**), auf die wir unten zurückkommen. Beim Verkleistern der Stärke entsteht ein anderes Spectrum V, nach der Retrogradirung wieder das Spectrum B der Kartoffelstärke, und dies ist nunmehr für alle Stärkearten, sowie für Amylosen und Amylopectine völlig identisch. Es zeigen also auch Amylose und Amylopectine trotz ihrer sonst so verschiedenen Eigenschaften dasselbe Spectrum, und zwar das der Kartoffelgruppe, gleichgiltig aus welcher nativen Stärke sie entstanden sind. Es ist also auch Amylose kristallinisch; daß man sie meist für amorph angesehen hat, erklärt KATZ dadurch, daß es sich um nicht retrogradirte Amylose handelt, deren unscharfes V-Spektrum leicht mit dem „amorphen" Spektrum verwechselt werden kann. Die Ausbildung der Typen A und B beruht nur auf verschiedener Verteilung von Wasser an bestimmten Stellen der Gitter.

Die beiden typischen Diagramme, A der Weizengruppe, B der Kartoffelgruppe und der retrogradirten Form, können auch noch bei verwandten Stoffen auftreten, wie lösliche Stärke, Erythroamylose, Amylodextrin etc.; sie können also alle noch „retrogradiren"; nur das Glykogen macht eine Ausnahme. Zwischen A und B tritt das „Verkleisterungs-Spektrum" (V) auf, auch wenn keine offensichtliche Kleisterbildung statt hat **(199, 200)**. Dies gilt auch für typische Amylo-amylosen. Das Sol aus Kartoffelstärke ist amorph, beim Gelatiniren kristallisirt es aus. Bei niedriger Temp. entsteht dabei das B-Spektrum (Kartoffelgruppe), bei

---

193) ***J. R. Katz c.s.***, Physikal. Ch. der Stärke etc. I—VI. ebd., **A. 150,** 37—109 (1930). — 194) ***J. R. Katz*** (***A. Weidinger***), Physik. Ch. der Stärke 20, 21. Zs. physikal. Chem., **A 169,** 321, 339 (1934). — 195) ***St. v. Náray-Szabó***, Rö-Diagr. der nativen Stärke. Ann. Chem. (LIEBIG), **165,** 299 (1928). — 196) ***Ders.***, Stärkeabbau und Konst. der Stärke. Zs. physikal. Chem., **A 151,** 420 (1930). — 197) ***M. Samec, R. Klemen***, Eigensch. versch. Stärkearten. Koll. Beih., **33,** 254 (1931). — 198) ***Dies., J. R. Katz***, Einteil. der Stärkearten. Zs. physikal. Chem., **A 163,** 291 (1933). — 199) ***M. Samec, J. R. Katz, J. C. Derksen***, Verkleistern und Retrograd. bei den mit nativer Stärke verm. Subst. Zs. physikal. Chem., **A 158,** 321 (1932). — 200) ***J. R. Katz, J. C. Derksen***, Umwandl. von Stärkepräp. etc. ebd., **165,** 228, **167,** 129 (1933).

60° das A-Spektrum (Weizengruppe). Man kann also, je nach Art der Abscheidung, beide Formen künstlich erzeugen, was für die Entstehung der beiden natürlichen Typen wichtig ist (s. u.). Wasserhaltiger konz. Kleister aus Kartoffelstärke ist bei 80° amorph, bei Weizenstärke zeigt er das V-Spektrum, das aber auch hier bei stärkerer Verdünnung in amorphes Sol übergeht.

Alle Stärkearten mit A-Spektrum retrogadiren langsamer, als die mit B oder C, das V-Spektrum resp. kombinirte B + V-Spektrum bleibt wochenlang erhalten **(201)**. Die Geschwindigkeit des Retrogradirens ist abhängig vom Wassergehalt; der Vorgang wird durch Wärme gehemmt resp. bei > 60° aufgehoben **(202)**; ebenso wirkt durch Dehydratation Alkohol bei > 50 %, während schwächere Konzz. grade den richtigen Wassergehalt für schnelle Retrogradation herbeiführt. **(201)**. Stärke kann durch Alkohol auch amorph gefällt werden, andererseits bei Eingießen einer siedenden Lösung in einen großen Überschuß von Alkohol ein besonderes V-Spektrum zeigen, mit sehr scharfen Interferenzen. Das gewöhnliche V-Spektrum ist vielleicht durch Überlagerung eines Kristalldiagramms über ein amorphes Diagramm zu deuten **(203)**.

Molatgröße. Die genuinen Stärkearten sind in jedem Falle Kolloide von sehr hoher Aggregation. Ob diese auf der wirklichen Größe der „Moleküle", also der Ausbildung ungemein langer Ketten, oder auf der Association durch intermolekulare Kräfte irgend welcher Art beruht, das eben ist der noch nicht entschiedene Streitpunkt zwischen STAUDINGER und K. H. MEYER-H. MARK, sowie HAWORTH, den wir geschildert haben. Jedenfalls aber können auf verschiedenen Wegen diese sehr großen Molate verkleinert werden, ohne daß der Charakter als „Stärke" ausgetilgt wird, bedingt durch Nicht-Reduciren, Jodfarbe, Drehung etc. Ob diese Änderungen rein kolloidchemische Peptisirungen sind (SAMEC) oder eben doch schon Hydrolysen oder sonstige Lösung von Hauptvalenzen, hängt wieder mit dem Kernproblem zusammen.

So betragen nach SAMEC (l. c. 5, S. 253) die Molatgrößen bei Kartoffel: Amylo-amylosen ca. 80—100.000, Hülle innen 125.000, aussen bis 155.000. Bei Maisstärke fand sich 77.500, bei *Marantha*-Stärke 260.000. Die künstlich hergestellten „löslichen Stärken" haben Molatgewichte von etwa 50.000 bis zu 20.000. Letztere sind aber schon wirklich abgebaut, zeigen Reduktion (Amylodextrine). Bei der wahrhaften Hydrolyse, z. B. durch Amylasen, zerfallen mit dem Auftreten von Reduktion, also Zerlegung der Ketten, diese Aggregate sehr schnell. Nach einer Tabelle von SAMEC (l. c. 5, S. 451) beträgt z. B. bereits nach 1 h der überhaupt noch kolloide Rest (bei erhaltener blauer Jodreaktion) nur noch 30 %, und dieser hat nur noch ein Molatgewicht von 19.000; nach ebenfalls 1 h (anderer Versuch) die Reduktionskraft auf 100 g Substanz 68,64. Aber schon nach 3′ ist diese 15,84, wenn der kolloide Rest noch 91 % mit einem Molatgewicht von 106.000 beträgt. Der Stärkeabbau an sich beginnt also sofort mit der Lösung von Glykosidbindungen. Freier Zucker (vergärbar) tritt aber nicht sofort auf. Weiteres s. § 373. Auch bei der Abspaltung von PhS durch Amylophosphatase (WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 239a) tritt bereits Des-association und Reduktion auf.

Eine der wichtigsten Fragen ist die nach der Natur der beiden Hauptbestandteile der natürlichen Stärke, **Amylose und Amylopectin**, die bereits im H.W. eingehend behandelt ist. Eine zufriedenstellende Klärung der entscheidenden Frage, ob hier nur dispersoidchemische Unterschiede oder auch strukturelle obwalten, liegt auch heute noch nicht vor. Von den Anhängern der „Maltoseketten-Theorie" wird jegliche chemische Differenz zwischen beiden Anteilen abgeleugnet, und alle Unterschiede auf die Länge und Lagerung der Ketten und auf physikochemische Momente abgeschoben, so insbesondere von HIRST **204)**, während wie schon früher PRINGSHEIM

201) ***J. R. Katz***, Physikal. Chem. der Stärke etc. 22, 23. ebd., **170**, 421, 430 (1934). — 202) ***J. R. Katz, A. Weidinger***, Hemmung ... röntgenspektrosk. Retrograd. durch Wärme etc. ebd., **171**, 181 (1934). — 203) ***J. R. Katz, A. Weidinger***, Polymorphie bei Stärkepräpar. Réc. Trav. chim., **53**, 949 (1934). — 204) ***E. L. Hirst, M. M. T. Plant***, Mol. Struct. of amylose etc. Jl. of Chem. Soc. **1932**, 2375.

und Ling nunmehr insbesondere Samec und Waldschmidt-Leitz **205)** daran festhalten, daß hier Unterschiede in den Ketten selbst vorliegen, vielleicht tatsächlich, wie Pringsheim von jeher behauptet hat, ein Baustein von 3 Glucosen im Amylopectin, jedenfalls aber eine andere Verteilung der reaktionsfähigen OH-Gruppen.

Zur Benennungsfrage sei folgendes vorausgeschickt: es macht sich, insbesondere durch die Bemühungen Samecs **206)**, das Bestreben geltend, die beiden Anteile nur noch nach ihrem physikochemischen Verhalten und dem P-Gehalt, nicht mehr nach der Jodreaktion, zu benennen, Amylose ist dann die elektrolytfreie, nicht kleisterbildende, vielmehr glatt lösliche Substanz, Amylopectin die kleisterbildende PhS-haltige Substanz. Zwar stimmt es grade bei der am meisten untersuchten Kartoffelstärke, daß Amylose mit Jod blau färbt, Amylopectin rot bis violett, aber das ist durchaus nicht überall so. Grade deswegen trennt Samec ja von jeher Amylo-amylose (blau) von Erythro-amylose, wie sie zwar zuerst aus Kartoffel-amylopectin durch Abspaltung der PhS erhalten wurde, wie sie aber auch natürlich vorkommt (s. u.). Andererseits ist auch nur bei wenigen Stärkearten, und wieder Kartoffel, das Amylopectin ausschließlich der Erythrogruppe zugehörig; es gibt also auch mit PhS veresterte Amylo-amylosen. Natürlich ist diese Benennungsfrage auch sachlich bedeutungsvoll, denn wenn es elektrolytfreie und physikalisch-chemische ähnliche Amylosen mit verschiedener Jodfarbe gibt, so legt dies den Gedanken einer chemischen Verschiedenheit nahe, wie sie Samec tatsächlich vertritt. Trotzdem ist seine Nomenclatur auch von den Anhängern der chemischen Gleichheit teilweise angenommen, z. B. von Haworth.

Es sei ganz kurz aus dem H.W. die Charakteristik beider Substanzen für Kartoffelstärke wiederholt:

Amylose ist die Innensubstanz des Stärkekorns, ist praktisch elektrolytfrei, wenig hydratisirt, in Wasser glatt ohne Kleisterbildung kolloidal löslich, gibt blaue Jodreaktion. Drehwert ca. 189°. Molatgröße nach Samec ca. 80.000; jedoch werden bei anderen Verfahren (z. B. nach Ling und Nanji) bereits desaggregirte Amylosen erhalten.

Acetyl-amylose hat ein Molatgewicht von ca 200.000, zerfällt aber beim Erhitzen und nachfolgendem Abspalten der Essigsäure in kleinere Teile von 20.000—66.000 (Samec **207)**). Amylose fällt mit Alkohol bei 65 %, ebenso fällt Jod schon eine Amyloselösung von 0,1 % (Baldwin **208)**). Cellulose adsorbirt sie aus ihrer Lösung; ebenso wird sie von Kollodiummembranen fast vollständig adsorbirt, nicht aber nach Blaufärbung mit Jod (**209**). Amylose und noch leichter die blaue Jod-Amylose werden durch allerlei Salze ausgeflockt.

Amylopectin, die Hüllsubstanz des Stärkekorns, ist charakterisirt durch den Gehalt an Phosphorsäure, der Amylo-PhS Samec's; ferner enthält es auch Kieselsäure. Die Amylo-PhS hat die PhS an ein C_6 gebunden, da nach Posternak **210)** beim Abbau erst durch Diastase, dann Säure ausschließlich Glucose-6-PhS entsteht.

Die Menge an PhS schwankt stark, am meisten enthält das Amylopectin der Kartoffel, dann Weizen, Mais; am wenigsten Reis und Tapioka (Tabelle bei Samec, l. c. 5, S. 29). Der

---

205) ***M. Samec, E. Waldschmidt-Leitz***, Enz. Spaltbark. der Amylo- und Erythrokörper aus Stärke. Zs. phys. Chem., **203**, 16 (1931). S.A. — 206) ***M. Samec***, Kartoffelamylopectine. Bioch. Zs., **205**, 104 (1930). — 207) ***M. Samec, L. Knop***, Teilchengrösse der Amylose etc. Koll. Beih., **39**, 438 (1934). — 208) ***M. E. Baldwin***, Separ. of the two main compon. of potato starch. Jl. Amer. Chem. Soc., **52**, 2907 (1930). — 209) ***J. Nowopokrowsky c.s.***, Verkleister. der Kartoffelstärke. Kolloid-Zs., **52**, 302 (1930). — 210) ***Th. Posternak***, Phosphore de la fécule etc. C. R., **197**, 1157, **198**, 506 (1933/34).

Brutto-P-Gehalt hat also mit der sonstigen Verwandtschaft der verschiedenen Typen von Amylopectin nichts zu tun, da z. B. Kartoffel und Tapioka sonst sehr ähnlich sind, ebenso Weizen und Reis (s. u.). Amylopectin ist schwach sauer (Ausnahme Reis) und stark hydratisirt, gibt mit heißem Wasser den Kleister, wird durch Alkohol noch bei 85 % nicht gefällt, ebenso nicht mit Jod (BALDWIN **208**)). Die Hydratisirung ist verschieden stark, nimmt von Kartoffel über Reis, Mais zu Weizen ab (OSTWALD **211**)). Näheres über die damit zusammenhängenden Verschiedenheiten s. u. Jodfarbe violett. Drehwert ca 195°. Molatgewicht nach SAMEC ca 130.000.

Verschiedene neuere Trennungsverfahren (Elektrodialyse, SAMEC, Ausfrieren, LING) ergaben bei Kartoffelstärke sowie Tapioka und *Marantha* ein Verhältnis Amylose zu Amylopectin von 17 : 83, s. a. SAMEC **212**) und l. c. 5, SS. 29, 194; BALDWIN **208**) kam durch Ausfrieren nach LING und Extraktion des Filtrations-Rückstandes mit Wasser bei 55—60° (mehrfach wiederholt) zu demselben Wert. Dagegen fand SAMEC für Reis 80, Mais 76, Weizen 63 % Amylopectin.

Ganz im Gegensatz dazu geben LING c.s. **213**) an, daß alle diese hohen Werte für den wahren Gehalt an beiden Anteilen irreführend sind; sie sollen dadurch vorgetäuscht sein, daß nur ein relativ kleiner Teil der Amylose leicht löslich und unabhängig vom Amylopectin im Innern des Korns sitzt, der Hauptteil soll in kolloider Form mit beim „Amylopectin" sein und zwar fest gebunden; sei es in fester Lösung fein verteilt oder adsorbirt, so daß dieser Anteil der Amylose nach diesen Methoden mit zum Amylopectin gerechnet wird. Auf indirektem Wege kommen sie zu der Annahme, daß die verschiedenen Stärken nur 32—34 % Amylopectin enthalten. Zu etwa demselben Wert (33 % Amylopectin) kam v. PRZYLECKI **213a**) mit einer ganz anderen Methode: Beim Ansäuern einer auf 80—90° erhitzten Stärkelösung fällt das Amylopectin aus.

Diese Zahlen, die im übrigen ungefähr den älteren Angaben von GRUZEWSKA (*l. c. 60*) (40—45 %) entsprechen, beleuchten wieder schlagartig die seit dem Beginn dieser Forschungen nicht überwundene Schwierigkeit, zu definiren, womit man eigentlich zu tun hat. „Amylopectin" ist eigentlich immer nur gerade das, was ein bestimmter Forscher mit grade seiner Methode herausbekommt.

So hat SAMEC seine Zahlen mit der Elektrodialyse erhalten, während LING c.s. die ihren aus der Resistenz ihres „Amylopectins" gegen Gerstenamylase indirekt über das Ergebnis an Maltose (Amylose-spaltung) berechnet haben. SAMEC (l. c. 5, S. 34) erkennt deren Ansicht über die Verteilung der Amylose im Amylopectin an, meint aber, daß seine Methode auch diesen Anteil mit erfaßt, also seine Zahlen ungefähr richtig sind. Aber auch seine eigenen Zahlen haben sehr erheblich gewechselt, selbst in seinem Buche (l. c. 5) an verschiedenen Stellen, z.B. S. 29: Knollenstärken „über 80 %", Samenstärken 63—79 %, wie wir oben angegeben haben, dagegen gibt die Tabelle S. 194 viel niedrigere Werte (Kartoffel 73,5, Weizen 59,6, Reis 38,2 (!)); und das alles mit derselben elektrodialytischen Abscheidung; auch danach ist es also schwer zu sagen, welche Zahlen nun endgiltig sind. Hierzu sei nur noch bemerkt, daß SANDE-BAKHUYZEN **214**) behauptet, man könne Amylose in Amylopectin und umgekehrt überführen: Wasser und Alkali liefert Amylose, Wasserentziehung (Alkohol, Tannin) Amylopectin.

Wir haben schon im H.W. berichtet, daß die Begriffe Amylose und Amylopectin sich aus anderen älteren Bezeichnungen für verschiedene Stärkeanteile heraus entwickelt haben. Auch heute noch ist die Beziehung des Amylopectins zu anderen resistenteren Bestandteilen des Stärkekorns undurchsichtig, so zu den seit altersher beschriebenen amylase-resistenten SiO_2-

---

211) ***Wo. Ostwald, R. H. Hertel,*** Koll. Chem. Reakt. zwischen, .. Eiweißkörpern und KH. Kolloid-Zs., **47,** 357 (1929). — 212) ***M. Samec, M. Minaeff, N. Ronžin,*** Die aus versch. Stärkearten dargest. Amylopectine. Koll. Chem. Beih., **19,** 203 (1924). — 213) ***A. R. Ling, D. R. Nanji,*** Const. of polymer. amyloses etc. Jl. of Chem. Soc., **127,** 629 (1925). — 213a) ***St. J. v. Przylecki, S. Dobrowolska,*** Bind. zwischen Amylopektin und Eiweißkörpern. Bioch. Zs., **245,** 388 (1932). S.A. — 214) ***H. L. van de Sande-Bakhuyzen,*** Starch grains of wheat etc. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **23,** 195 (1925); BPh **35,** 778.

haltigen Amylocellulosen und den von Malzamylase glatt in Maltose zerlegten, aber von Gersten-amylase nicht angegriffenen kleisterbildenden P- und SiO_2-haltigen Amylo-hemicellulosen LING's 215).

In beiden soll die Kieselsäure eine entscheidende Rolle spielen. MALFITANO 216) 217) hält die Amylocellulosen für echte Komplexe um die Kieselsäure, LING die Amylo-hemicellulosen für Ester der Kieselsäure mit Amyloamylosen. Nach SAMEC 218) (l. c. 225) kann man aber die gesamte Kieselsäure aus dem Stärkekorn durch HF auswaschen, ohne daß sich die Eigenschaften der genannten Stoffe ändern; er glaubt, daß die erhöhte Resistenz nur im Aggregationszustand des organischen Anteils zu suchen ist (l. c. 5, S. 37). Wir können auf diese Dinge nicht näher eingehen.

Bisweilen kommen beide Anteile allein vor. Die „Pilzstärke" von *Aspergillus niger* erwies sich nach SCHMIDT 219) als der Amylose nahestehend. Sie wird durch beide Amylasen (Malz und Pankreas) abgebaut, ohne daß sich die rein blaue Jodreaktion ändert, die eben nur allmählich verschwindet. Dagegen soll eine Amylase des Pilzes selbst eine Erythrostufe bilden (?). Der Aufbau dieser Pilzstärke vollzieht sich anscheinend über eine keine Jodreaktion gebende Vorstufe Paradextran oder Fungose.

Eine Amylose ist auch das **Isolichenin**, das sich nach PRINGSHEIM (l. c. 155) 220) neben Lichenin in den Flechten vorfindet; ebenfalls blau färbend. Es ist z. T. an Schwefelsäure gebunden, verhält sich enzymtypisch genau wie Amylose, gibt quantitativ Maltose. Es kommt nach SCHMIDT 219) mit wenigen Ausnahmen nur im Hymenium vor, nicht im Thallus. Nach KARRER 221) ist es kein reines Glucan, enthält vielmehr Mannan.

Dagegen entspricht z. B. die Stärke des Klebreises (*Oryza glutinosa*) dem elektrolytfreien organischen Teil des Amylopectins, der Erythro-amylose (SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ l. c. 205). Rotfärbend ist auch die Stärke aus Wachsmais, die ebenfalls elektrolytfrei ist und nach HAWORTH 222) keinen Kleister ergibt; sie ist sehr P-arm (0,0016 %) und wird von β-Amylase (Malz) langsamer gespalten als gewöhnliche Maisstärke (BRINK 223)), es entsteht aber nur Maltose.

Die Amylopectine verschiedener Stärkearten zeigen, wie SAMEC c.s. schon in früheren Arbeiten (l. c. 5, S. 28) (224—226) und neuerdings besonders mit KLEMEN (l. c. 197) und in Gemeinschaft mit KATZ (l. c. 198) in Anlehnung an die verschiedenen Typen der Röntgendiagramme (s. o.) an 30 verschiedenen Stärkearten untersucht haben, parallel mit den Röntgentypen abweichende Eigenschaften in bezug auf äußeres Verhalten, P-Gehalt, H-Ionenkonz., Leitfähigkeit etc. Es gibt auch dabei zwei Haupttypen, den „Kartoffel"- und den „Weizen"-typus, dazu einen in der Mitte stehenden dritten Typus, denen die Diagrammen B und A, resp. C entsprechen.

Kartoffeltypus (B-Spektrum)	Weizentypus (A-Spektrum)
gelatinös, stark zügig	dünn, nicht zügig
klar durchsichtig	milchig weiß
hohe $[H^+]$	20 mal kleinere $[H^+]$

Bei C sind die verschiedenen Eigenschaften verschieden verteilt. Die Entstehung der Abarten hängt z. T. vom Wassergehalt der Organe ab. Die Verschiedenheiten hängen nicht von

---

215) ***A. R. Ling, D. R. Nanji,*** Nat. of the amylo-hemicelluloses. Jl. of Chem. Soc. **1925,** 652. — 216) ***G. Malfitano, M. Catoire,*** Micellarzustand der Stärke. Kolloid-Zs., **46,** 3 (1928). — 217) ***G. Malfitano, M. Catoire,*** Grandeurs des unités micellaires etc. Paris 1934; BPh 85, 452. — 218) ***M. Samec,*** Micellarzustand der Stärke. Kolloid-Zs., 47, 81 (1929). — 219) ***D. Schmidt,*** Pilzstärke bei Asp. niger. Bioch. Zs., **158,** 223 (1925). — 220) ***H. Pringsheim,*** Flechtenstärke. Zs. phys. Chem., **144,** 241 (1925). — 221) ***P. Karrer,*** Isolichenin etc. ebd., **148,** 62 (1925). — 222) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, M. D. Woolgar,*** Mol. Struct. of waxy maize.starch. Jl. of Chem. Soc., **1935,** 177. — 223) ***R. A. Brink,*** Nature of waxy starch. Biochem. Jl., **22,** 1349 (1928). — 224) ***M. Samec,*** Weizenstärke. Bioch. Zs., **186,** 337 (1927). — 225) ***Ders.,*** Verteil. von P und N innerh. des Stärkekorns. ebd., **195,** 72 (1928). — 226) ***Ders.,*** Aufbau der Stärkekörner. Zs. ges. Getreidew., **21,** 111, Chem. Zbl. **1934,** II, 855.

den an die PhS gebundenen verschiedenen Kationen ab, da sie auch nach deren Entfernung (verd. HCl) bestehen bleiben (SAMEC, l. c. 5, S. 30).

Der Gehalt an P ist in wasserreichen Organen hoch, weil nur stark phosphorylirte Erythroamylosen hier stabilisirt und abgelagert werden können. Diese zeigen dann das Retrogradations-spektrum der Kartoffelstärke. Wo die Phosphorylirung gering ist, zeigen sich im Sol der Elektrodialyse Erythroamylosen (Edelkastanie (*Castanea*), *Colchicum*, *Fagopyrum*). Samenstärke wird dagegen so schnell abgeschieden, daß keine Retrogradation erfolgt.

Es besteht ein ständiger Unterschied zwischen diesen Amylopectinen aus Knollen und aus Samen, besonders in Bezug auf die Leitfähigkeit. Diese entspricht bei dem A. der Samen durchaus nicht dem Gehalt an PhS, so daß SAMEC hier eine weitere Bindung der Amylo-PhS an Eiweiß annimmt, während beim „Kartoffeltypus" ein einfaches K-Salz vorliegt; jedoch kommen solche Protein-amylo-phosphate auch in den Erythro-Körpern aus Kartoffelstärke vor (SAMEC u. BLINC **227**)). Beim Waschen mit verd. Säuren, bei der Elektrodialyse, beim Kochen unter Druck bleiben N und P gebunden, dagegen geht das N mit n/20 KOH zum größten Teil heraus, und dann entspricht der Rest tatsächlich dem Amylopectin der Kartoffel. Ähnlich verhalten sich in Bezug auf P und N die „Amylo-cellulosen" einiger Stärkearten; die der Kartoffel läßt sich N-frei darstellen. SAMEC nimmt also eine Verankerung der Stärke an das Proteingerüst der Pflanzenzelle an. Diese N und PhS enthaltenden Symplexe finden sich hauptsächlich in der Außenhülle, aber auch in der Innensubstanz, bei deren Dialyse sie im Gel verbleiben. Da diese Symplexe heute vielfach diskutirt werden und man solchen Bindungen einen erheblichen biologischen Wert beimißt, werden wir darauf gesondert zurückkommen (§ 372a).

Eine gewisse Umwandlung von Mais-amylopectin nach dem Kartoffel-amylopectin hin gelingt nach SAMEC und BLINC **228**) durch eine leichte Oxydation, wie sie bei der Fabrikation von Quellstärke erfolgt, oder direkt durch sehr verdünntes NaOCl. Hierbei wird die Stärke stark sauer, wie es sonst eben beim Kartoffel-amylopectin die PhS bedingt, und die Gel-phase zeigt das Aussehen und Verhalten von Kartoffel-amylopectin infolge stärkerer Hydratisirung und Verkleinerung der Teilchen. SAMEC nimmt eine chemische Änderung an: Aufspaltung von O-Brücken mit Freilegung von Aldehydgruppen (starke Reduktion), die dann z. T. zu Carboxylen oxydirt werden; und diese neu eingebauten Säuregruppen leisten dasselbe, was sonst die PhS leistet; und zwar, wie SAMEC schon früher gezeigt hat, auch künstlich eingeführte PhS. — Umgekehrt kann man bis zu einem gewissen Grade Amylopectin von Kartoffel dem Weizentypus annähern, wenn man es mit einem großen Überschuß von Protein (Gelatine oder Ei-albumin) versetzt (**229**).

Die **Phosphorsäure** der Amylopectine, die wie oben bemerkt (l. c. 210) an das C_6 einer Glucose gebunden ist, sitzt relativ fest. SAMEC **230**) fand, daß die Zerlegung der Stärkeketten mit allen Amylasen schneller vor sich geht als die P-Abspaltung, so daß die entstehenden Dextrine immer reicher an P werden, und zwar sowohl in der elektrodialytisch getrennten Sol- wie Gelphase; Achroodextrine aus Amylopectin sind also am reichsten an P. Es ist aber möglich, und zwar durch KOH und dann Elektrodialyse, völlig (Weizen) oder fast völlig (Kartoffel) P-freie Solphasen zu erhalten, die noch native Amylose sind (Jodfarbe tiefblau, Molatgew. 80.000) (**231**). Aus Amylopectin (Druckkochung, Elektrodialyse) kann man das P bis auf 0,02 % entfernen (**232**). Es ist also nicht möglich, daß die PhS im Sinne MALFITANO's (l. c. 216) ganz in einen WERNER'schen Komplex eingelagert ist; dagegen spricht auch der Umstand, daß man die an die PhS gebundenen Kationen mit ganz verdünnten Säuren ohne Weiteres entfernen kann. Dasselbe gilt für die Kieselsäure (s. u.). Andererseits ist die gesamte PhS wirklich als Ester gebunden, und zwar als Mono-Ester, wie die erhebliche Menge Kationen

---

227) ***M. Samec, M. Blinc,*** Erythrosubstanzen. Koll. Chem Beih., **30,** 163 (1930). S.A. — 228) ***M. Samec, M. Blinc,*** Quellstärke. — Veränder. der Stärke durch oxyd. Einfluß saurer Gruppen. Koll. Beih., **38,** 40, 48 (1933). — 229) ***M. Samec,*** Reakt. der Stärke mit Eiweißkörp. Koll. Beih., **40,** 449 (1934); BPh **85,** 7. — 230) ***Ders.,*** Stärkedextrine, Bioch. Zs., **187,** 120 (1927). S.A. — 231) ***Ders.,*** Micellartheorie der Stärke. ebd., **218,** 249 (1930). — 232) ***Ders.,*** Reaktion der Stärke mit sehr verdünnter Lauge. Bull. Soc. Chim. Yougoslav., **4,** 71 (1935), Chem. Zbl. **1935,** I, 3669.

zeigt, welche die PhS bindet (ca. 1,5 Aequivalente auf 1 Grammatom P). Amylo-PhS ist also eine zweibasische Säure; dies bestätigt die potentiometrisch gemessene Neutralisations-Kurve (**232**). Es wird also auch die Annahme MEYER's **235**) bestritten, daß ein Teil der PhS als Di- und Triester zur Verbindung verschiedener Ketten gebunden ist, der Rest einfach durch Oberflächenreaktionen resp. permutoid gebunden. In der Weizenstärke sitzt das P viel loser als in der Kartoffelstärke, mit alkoh. NaOH geht das P aus ersterer zu 90 % heraus, N zu 75 %, ohne daß sie sich kolloidchemisch ändert; bei derselben Behandlung wird Kartoffelstärke in dieser Hinsicht verändert, ohne daß ihr P- und N-Gehalt sich nennenswert ändert (**233**). KARRER **236**) zweifelt diese Ergebnisse SAMEC's an, P und Eiweiß haben keine essentielle Bedeutung, die Verschiedenheiten werden durch „strukturirte" Elemente („Stärkehäutchen", HESS **237**)) bedingt. Antwort von SAMEC **238**). Auch beim Glykogen ist die gesamte PhS zu entfernen und hat keine Bedeutung als Struktur-Element zur Verbindung der Ketten (REICH **239**)).

Nun hat aber die Frage der Bindung der PhS ein anderes Gesicht bekommen. Daß Phosphatasen aus P-haltiger Stärke, der Amylophosphorsäure, die PhS abzuspalten in der Lage sind, haben wir bereits § 286 kurz berichtet. Nun hat aber WALDSCHMIDT-LEITZ **239a**) aus der Gerste ein Enzym isolirt und von den Amylasen getrennt, das eine besondere Phosphatase mit starker relativer Spezifität eben für Amylo-PhS ist (Näh. § 379). Diese **Amylophosphatase** spaltet aus P-haltigen Stärken die PhS ab; gleichzeitig aber tritt eine erhebliche Verkleinerung der Molate, gekennzeichnet durch Abfall der Viskosität ein, sowie sofort Reduktion. Es wird also gleich im Anfang unter der Wirkung dieses Enzyms eine reduzirende Gruppe geöffnet, die durch Bindung an PhS abgeschirmt war, und andererseits in irgend einer Form für die höhere Association verantwortlich war. Näheres ist noch nicht bekannt. Es ist möglich, daß die PhS nur an einer Gruppe sitzt, die nach ihrer Ablösung reduzirt, es ist aber auch möglich, daß die PhS doch mehrere Ketten mit einander verbindet, was den schnellen Abfall der Viscosität noch leichter verständlich machen würde. Es scheint also die ganze Frage der Bindung der PhS in den Stärken einer Revision zu bedürfen.

Künstlich phosphorylirte Stärke ist viel resistenter gegen Amylasen, am besten wirkt noch Speichel; Malz und Taka kaum (spezifische Wirkung von α-Amylase?). Auch die so entstehenden künstlich phosphorylirten Dextrine werden im Maaße des Abbaus P-reicher, ebenfalls in der Sol- wie in der Gelphase. — Über phosphorylirte Zwischenprodukte bei der Säurehydrolyse (PhS von Di- oder Trisaccharid) **234**). Dasselbe was die PhS im Amylopectin ist, soll die Kieselsäure in den Amylocellulosen (s. o.) sein, die WERNER'sche Komplexe von Amylose + SiO_2 sind (LING l. c. 215; MALFITANO l. c. 216); Antwort von SAMEC (l. c. 218).

Amylo-amylosen und Erythro-amylosen. Es ist selbstverständlich, daß ein erheblicher Teil der Unterschiede zwischen Amylose und Amylopectin eben auf der Bindung von PhS an das letztere beruhen. Aber auch, wenn man die PhS aus dem Amylopectin nach der Methode SAMEC's teilweise entfernt (durch Kochen und Elektrodialyse zur Trennung von Solen und Gelen) und so als Gegenstück zu der elektrolytfreien Amylose (Amylo-amylose SAMEC's) die Erythro-amylose herstellt, zeigen beide Stärkearten ganz erhebliche Unterschiede im physikalisch-chemischen und kolloidchemischen Verhalten, die nicht nur auf die noch vorhandene PhS in den Erythrokörpern zu beziehen sind, und die sich auch zum Teil auf die entspr. Dextrine fortsetzen. Wir sind diesen Differenzen zwischen der Amylo-struktur und der Erythro-struktur immer wieder begegnet und wollen hier nicht Alles wiederholen. So sei hier nur einiges vermerkt. Die Amylo-

233) ***M. Samec***, Bez. zw. P und N in der Kartoffel- und Weizenstärke. Koll. Ch. Beih., **33**, 95 (1931). — 234) ***Ders.***, P-halt. Abbauprod. der Kartoffelstärke. Koll. Chem. Beih., **33**, 449 (1931). — 235) ***K. H. Meyer***, Chemie der Micelle etc. Bioch. Zs., **208**, 1 (23) (1929). — 236) ***P. Karrer, E. v. Krauss***, Physikal. Struktur der Stärke. Helv. Chim. Acta, **12**, 1144 (1929), **15**, 48 (1932). — 237) ***K. Hess, F. A. Smith***, Kartoffelstärke II. Ber. Chem. Ges., **62**, 1619 (1929). — 238) ***M. Samec***, P-, N- und Si-Gehalt der Stärkefraktionen. Helv. Chim. Acta, **15**, 43 (1932). — 239) ***W. S. Reich***, Glycogène. C. R., **194**, 2141 (1931). — 239a) ***E. Waldschmidt-Leitz, K. Mayer***, Amylophosphatase aus Gerste. Zs. phys. Ch. **236**, 168 (1935). S.A.

struktur ist Träger der blauen Jodreaktion, die Erythrostruktur die der roten (§ 371), was darauf beruht, daß die Amylokörper viel reichlicher Jod aufnehmen (s. u.).

Die Erythrokörper zeigen auch in reinem Zustande eine viel größere Lösungsstabilität, auch gegenüber der Fällung mit Jod, als die Amylokörper (241); Baumwolle absorbirt die Amylokörper viel stärker, sie sind auch stärker aufgeladen und stärker hydratisirt; sie werden anfangs langsamer, dann aber schneller durch Säuren hydrolysirt als die Erythrokörper. Die Viscosität nimmt nur bei den Amylokörpern mit steigender Temp. ab, was auf eine stärkere Association schließen läßt (242).

Mit dieser Stabilität hängt es auch zusammen, daß die Erythrokörper viel langsamer in den Solen aggregiren, d. h. die BROWN'sche Bewegung einstellen (SAMEC 240) 241)), etwa erst nach 30—34 Tagen gegen 12 Tage bei den Amylo-Solen. Auch die Form der Aggregate ist verschieden: bei Amylo kugelige Haufen, bei Erythro perlschnurartige Gebilde; die entspr. Jodreaktion geht dieser Eigenart genau parallel. — Neue Darstellung von Erythrokörpern durch Kochen der Gele, erneuter Befund reiner Erythrokörper von geringem Molatgewicht (ca. 5000) 243).

Diese Beobachtungen führen SAMEC 241—243) zu dem Schluß, daß hier verschiedene Anordnungen des organischen Gerüstes — also ganz abgesehen von der PhS — vorhanden sein müssen. Sie haben verschiedene Oberflächenbildungen: bei den Amylokörpern finden sich in symmetrischer Verteilung OH-Gruppen mit starken Associationskräften, während diese Kräfte bei den Erythrokörpern mehr gegenseitig abgesättigt sein müssen. Dies zeigt sich an der viel stärkeren Adsorption von Jod (blaue Färbung) bei den Amylokörpern. Die Erythrokörper sind (wie die Perlschnurbildung zeigt) polar gebaut. Nimmt man ferner hinzu, daß Amylose und Amylopectin verschiedene Drehwerte haben (s. o.), so deutet dies auf eine erhebliche Verschiedenheit in der Struktur selbst. Dazu kommt nun das längst beobachtete, aber erst kürzlich durch SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 125) näher präcisirte enzymtypische Verhalten. Beide Gruppen haben den beiden Amylasen angepaßte verschiedene Angriffsgruppen: die α-Amylase ist specifisch eingestellt auf die Amylogruppirung (§§ 366a, 379).

Welcher Art aber nun die angenommenen chemischen Verschiedenheiten sind, das führt eben wieder in das noch unerhellte Dunkel der Stärkechemie überhaupt zurück, nämlich auf die Grundfrage, ob neben Biose-Ketten — ob nun sämtlich normale Maltose oder nicht — auch Triose-Ketten als Baugruppen anzuerkennen sind, und zwar im Amylopectin, während alle Untersucher über die Biose-Ketten in der Amylose einig sind. Diese Frage haben wir in allen vorhergehenden Abschnitten behandelt; sie muß auch heute noch als offen angesehen werden. Sieht man davon ab, so sind andere Struktur-Unterschiede bisher nicht einmal hypothetisch schärfer präcisirt worden, denn auch die von SAMEC betonten beziehen sich ja nur auf allgemeine Strukturprobleme.

Hierzu sei noch kurz erwähnt, daß REICH 245) auf grund eines neuen Verfahrens besonders milder Acetylirung, bei dem kein Abbau erfolgen soll, eine neue Ansicht vertritt. Natürliche Stärke und Amylopectin liefern dabei ein Diacetat (strikter Gegensatz zu FRIESE 246), und allen bisherigen Angaben), Amylose ein Triacetat; Diacetat ist in $CHCl_3$ unlöslich, kann dadurch

---

240) ***M. Samec,*** Verh. der Stärkesole im Dunkelfeld. Bioch. Zs., **195,** 40 (1928). — 241) ***M. Samec, M. Blinc,*** Erythrosubstanzen. Koll. Chem. Beih., **30,** 163 (1930). S.A. — 242) ***M. Samec,*** Differenz. der Amylo- und Erythrokörper. ebd., **33,** 103 (1931). S.A. — 243) ***M. Samec, L. Knop,*** Bereit. und Dispers. von Erythrokörp. ebd., **39,** 421 (1934). — 245) ***W. S. Reich, A. F. Damanski,*** Constitut. de l'amidon. C. R., **196,** 1610 (1933). — 246) ***H. Friese, F. A. Smith,*** Kartoffelstärke. Ber. Chem. Ges., **61,** 1975 (1928).

getrennt werden. Zu demselben Ergebnis führt die Benzoylirung (247). Bei der Verseifung entstehen die betr. Stärkearten zurück. Die Autoren schließen daraus, daß Amylopectin allein die native Grundsubstanz ist, und daß sich bei der präparativen Trennung eine vorher irgendwie verschlossene oder abgeschirmte Hydroxylgruppe in jedem Glucose-teil öffnet. Das erinnert an die Ansicht von EFFRONT 248) der ebenfalls Amylose für ein bereits durch Hydrolyse entstandenes Kunstprodukt hält, eine „Poly-hexose", etwa $(C_6H_{10}O_5)_{12} \cdot H_2O$.

Auf dem erwähnten enzymtypischen Verhalten der verschiedenen Stärkeanteile hat nun VAN KLINKENBERG 249), 250) eine ganze Theorie des Stärkeaufbaus aufgestellt, die aber zweifellos in ihren Einzelheiten nicht genügend gestützt ist. Er unterscheidet den Enzymtypen entsprechend eine (im Glykogen rein vorhandene) jodfärbende α-Stärke, und eine nicht färbende β-Stärke, die er als „mutamere" Stärke-arten bezeichnet. Denn er meint, daß hier nun wirklich β-Gruppen in der einen Abart der Stärke vorhanden sind, die zur β-Maltose führen, wenn β-Amylase (Malz) einwirkt; die andere soll nur α-Gruppen haben, und von α-Amylase (tierische) angegriffen werden. Er berechnet aus den Gleichgewichtszahlen für Maltose, daß die genuine Stärke besteht aus 36 % α-Stärke (etwa = Amylopectin resp. Glykogen) und 64 % β-Stärke. Ein Angreifen von α-Stärke durch β-Amylase und umgekehrt soll von vornherein nicht stattfinden, z. B. soll Glykogen reine α-Stärke sein und mithin von reiner β-Amylase (Gerste) nicht angegriffen werden. Daß schließlich mit beiden Amylasen nur α, β-Gleichgewichts-maltose entstehen kann, soll darauf beruhen, daß sich die β-Stärke leicht in α umlagern kann (umgekehrt auch, aber viel weniger). Diese Theorie ist innerlich ziemlich haltlos, denn wir haben viel eher Grund anzunehmen, daß die genuine Stärke weder α- noch β-Maltose präformirt enthält, — und für die Anhänger der reinen Maltose-Ketten muß andrerseits die β-Maltose durch eine WALDEN'sche Umkehrung entstehen. Das haben wir ja bereits mehrfach besprochen. Durch eine einfache Mutamerie $\alpha \rightleftarrows \beta$ bei der Stärke selbst ist der Unterschied zwischen der Amylo-Gruppe und der Erythro-Gruppe sicher nicht zu erklären. Deren Existenz scheitert schon an der einfachen Tatsache, daß die zweifellos einheitliche Amylo-hexaose von WALDSCHMIDT-LEITZ (§§ 366, 367) ebenfalls noch durch beide Amylasen in der charakteristischen Weise gespalten wird, daß mit α-Amylase α-Maltose entsteht, mit β-Amylase β-Maltose.

Im übrigen stimmen die Voraussetzungen VON KLINKENBERG's nicht exakt. Erstens ist die tierische Amylase nicht nur α. Es ist besonders von WALDSCHMIDT-LEITZ gezeigt worden, daß wohl alle Amylasen beide Enzymabarten führen, nur die Verteilung ist verschieden (§ 379). In der Tat ist VAN KLINKENBERG's Angabe, daß tierische Amylase Stärke nur zu 36 % spaltet (α-Stärke) von VONK 281) widerlegt worden. Der Abbau geht — was man ja eigentlich längst weiß — viel weiter; allerdings bleibt bei Pankreasverdauung reiner Erythrokörper ein durch Pankreasamylase nicht weiter angreifbarer Rest (SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ l. c. 125), aber nicht von 64 %. Näh. § 379.

Identität beider Stärkeabarten? Trotz aller dieser Argumente gibt es immer wieder Stimmen von erheblichem Gewicht, welche jede wesentliche Differenz zwischen Amylosen und Amylopectinen ableugnen. Dies bezieht sich naturgemäß auf zwei Gesichtspunkte. Die eine Gruppe von Forschern erkennt wenigstens die physiko-chemischen Differenzen an, leugnet aber, daß ihnen chemisch-strukturelle Unterschiede zu grunde liegen. Andere aber leugnen überhaupt, daß es mehrere definirbare Unterarten der Stärke gibt, zum mindesten in einem biologisch einheitlichen Präparat, also z. B. Kartoffelstärke.

Die erste Ansicht haben wir schon mehrfach behandelt: es ist die Verteidigung

---

247) ***A. F. Damanski,*** Benzoylation de l'amidon. Soc. Biol., **114,** 1051 (1933). — 248) ***J. Effront,*** Nat. chim. de l'amylose. C. R., **190,** 1170 (1930). — 249) ***G. A. van Klinkenberg,*** Spez. der Amylasen. Zs. phys. Chem., **209,** 253, **212,** 173 (1932). — 250) ***Ders.,*** Specif.-Problem der Amylasen. Erg. Enzymforsch. III, 73 (1934). — 251) ***H. J. Vonk, J. P. Braak,*** Abbaugrenzen der Stärke bei der Einw. von Speichel- und Pankr.-Amylase. Proc. Roy. Acad. Amsterdam, **37,** 188 (1934). S.A.

der Theorie, daß das ganze Stärkemolekül aus nichts anderem besteht als aus einfachen polymeren Maltose-Ketten, wie sie von FREUDENBERG, K. H. MEYER und in besonderer Schärfe von der Schule HAWORTH vertreten wird. Ihr hat vor Allem HIRST 252) deutlich Ausdruck gegeben in dem Verdict, daß alle Stärkearten: Amylosen, Amylopectine, Glykogen, sich chemisch überhaupt nicht unterscheiden, und daß somit die beobachteten Differenzen nur auf sekundäre Momente, wie etwa eine andere Verschränkung der Ketten etc. zu beziehen sind, — von den selbstverständlichen physiko-chemischen Änderungen durch die Beladung mit Elektrolyten natürlich abgesehen. Auf diese §§ 364a, 366 eingehend behandelten Dinge brauchen wir nicht zurückzukommen; sie stehen eben in untrennbarem Zusammenhange mit dem noch nicht befriedigend gelösten Kernproblem der Stärkechemie überhaupt, nämlich welche Baugruppen in den Ketten wirklich enthalten sind. Hierzu sei nur noch wiederholt, daß nach KATZ (l. c. 193) beide Abarten nach der Verkleisterung, resp. Retrogradation dasselbe Röntgendiagramm aufweisen.

Noch weiter aber gehen andere Autoren, die überhaupt die Existenz dieser definirbaren Abarten der Stärke leugnen. Solche Stimmen sind schon früher immer wieder laut geworden, und es ist überaus schwer zu deuten, weshalb sie zu so widersprechenden Ansichten gelangen gegenüber dem großen Material, das über diese Abarten gesichert und bestätigt vorliegt. Es hat auch wenig Interesse, diese rein negativen dissentirenden Angaben lückenlos wiederzugeben. Es seien nur einige vermerkt.

So geben FRIESE c.s. 246) an, daß native Kartoffelstärke ein ganz einheitliches unlösliches Triacetat gibt, aus dem kein in organischen Solventien lösliches „Amyloseacetat" von einem unlöslichen „Amylopektin-acetat" getrennt werden kann. Ebenso aber mißlang ihnen jegliche Scheidung der Stärke selbst in die beiden Anteile im üblichen Sinne. Bei 80° gingen 80 % in Lösung, 20 % blieben als „Amylopectin" zurück (0,209 % P, $[\alpha]_D = +153°$ in n.NaOH), aber auch dies gab wieder dasselbe Acetat. Die Stärkekörner behalten beim Auslaugen ihre Form, werden nur kleiner; „Amylopectin" sitzt also nicht aussen als „Hüllsubstanz", sondern innen. Nach heißer Verkleisterung dargestellte Amylose-acetate sind in Chloroform löslich; dabei ist schon eine Hydrolyse aufgetreten. Beim Auslaugen mit lauwarmem Wasser wird das Stärkekorn von aussen her abgetragen, wobei ebenfalls schon Hydrolysen eintreten (253).

Auch aus den mühevollen Versuchen von HEININGER 254) geht hervor, daß ihm zwar zuerst — durch Zentrifugiren — eine Trennung von Amylo-amylose (36 %) und Amylopectin gelungen ist, daß aber bei weiterem Behandeln mit Wasser in der Wärme immer erneute Mengen Amylopectin in Lösung gehen, sich in eine Art Amylose verwandeln, bis schließlich nur 8 % des Amylopectins als endgiltig unlöslich zurück bleiben (Amylocellulose).

Und endlich behauptet TAYLOR 255) 256) einerseits, daß Stärke einen gewissen Anteil an alkalistabilem, also glykogen-ähnlichem Kohlenhydrat enthält; andererseits aber, daß „echte" Amylopectine nur aus Cerealien-Stärke, nicht aber aus Kartoffelstärke zu gewinnen sind. Durch sehr langes Vermahlen in einer Kugelmühle soll Kartoffelstärke völlig löslich in kochendem Wasser und filtrirbar durch Kollodium werden. Alkoholfällung liefert das Ausgangsmaterial zurück. Die Amylose BALDWIN's soll nur den Teil der Substanz darstellen, der zufällig der Retrogradation entgangen ist.

Glykogen. In welchem Verhältnis Glykogen zu den anderen Stärkearten steht, ist immer noch unklar. Es unterscheidet sich äußerlich durch die braune Jodreaktion und die Löslichkeit in Wasser ohne Verkleisterung (H.W. S. 663). Im übrigen ist die Jodfärbung nicht konstant, wirklich braun gibt nur das Glykogen der Leber, andere geben Nüancen nach rot-violett (l. c. 3, S. 211). Diese verschiedenen Jodfärbungen hängen mit dem Bindungszustand des Gl. in den Zellen zusammen (§ 372a). Die Drehung ist + 196 — 199°. Verbr. Wärme (+ 1 H_2O) je g. 3768,5 gcal. (BROOKENS 257)).

252) ***E. L. Hirst, M. M. T. Plant,*** Mol. Struct. of amylose etc. Jl. of Chem. Soc. **1932,** 2375. — 253) ***K. Hess, F. A. Smith,*** Kartoffelstärke II. Ber. Chem. Ges., **62,** 1619 (1929). — 254) ***R. Heininger,*** Physiko-chem. Abbau der Stärke. Koll. Beih., **35,** 1, (33) (1932). — 255) ***T. C. Taylor, G. M. Salzmann,*** Act. of aqu. alkali on starches etc. Jl. Amer. Chem. Soc., **55,** 264 (1933). — 256) ***T. C. Taylor, T. J. Schoch,*** Potato Starch. ebd., **55,** 4248 (1933). — 257) ***N. Brookens,*** Verbr.-Wärme des Glykog. Bioch. Zs., **260,** 446 (1933).

Abgeschlossen: 27. 9. 35. Ber. Phys. 88, H. 5/6.

Bei der Elektrodialyse läßt sich auch Gl. in Sol und Gel scheiden, verhält sich aber ganz anders als Stärke. Es geht viel mehr Sol in Lösung (80 %), und dies enthält sehr reichlich P (viermal so viel wie Amylopectin). Infolgedessen gelirt es auch nicht wie Amylose durch Phosphorylirung (SAMEC 258)). Beim Erhitzen auf 105° „altert" es (Leberglykogen), es wird weniger löslich; die Lösungen sind viscöser und setzen schließlich eine gelatinöse Masse ab (259). Gl. ist nur wenig aufgeladen und neigt nach BUNGENBERG DE JONG 259a) zur Coacervation. Die durch geringen Alkoholzusatz entstehende Opalescenz beruht auf hydrophoben Solen mit geringer negativer Ladung, die aus submikroskopischen coacervirten Tröpfchen bestehen.

Daß Gl. chemisch — also vom Elektrolytgehalt abgesehen — der Stärke überaus ähnlich, praktisch mit dem Amylopectin identisch ist, haben wir schon im H.W. berichten können. Es ist eben auch ein Vertreter der „Erythrogruppe". Es läßt sich ebenso acetyliren zu einem Acetat (PRINGSHEIM 260)), das bei der Verseifung wieder Gl. ergibt und ergibt ebenso mit Acetylbromid Acetobrom-maltose (KARRER). Nach HAWORTH c.s. 261) ist es völlig identisch mit der Stärke, gibt ein Triacetat, läßt sich auch voll methyliren und gibt bei der Aufspaltung ebenfalls 2, 3 6-Trimethylglucose.

Nach PRINGSHEIM liefert es dieselben Abbauprodukte (Trihexosan, Amylotriose), die wir bereits besprochen haben, das Acetat läßt sich desaggregiren zum Glykogesan (l. c. 157) Darstellung des Triacetats mit modificirter Methode REICH 262); Verseifung liefert wieder Glykogen, und zwar unter Befreiung von Phosphorsäure, die also nach REICH nicht zum Molekül selbst gehört (was ja auch SAMEC gegen K. H. MEYER annimmt (l. c. 232)).

HAWORTH führt demnach alle Unterschiede gegenüber Stärke nur auf die Lage („*size*") der betr. Micelle zurück.

Die Frage der Teilchengröße, der Kettenlänge und der Desaggregirung zu ganz niederen Produkten liegt genau so, wie bei den anderen Stärkearten. Das Molat entspricht dem der Stärke, ca. 114.000 (SAMEC l. c. 258).

Des-aggregirung in Resorcin (HERZOG 263), REICH 262)) bis zu einer Teilchengröße von 4 × C_6; in flüss. NH_3 (SCHMID 264)), Acetamid resp. Formamid zu 1 × C_6, wieder dem Glykogesan, das sich sowohl im festen Zustand wie in Lösung schnell wieder zu Glykogen re-associirt. — Kritik dieser Versuche von BERNER 265) (l. c. 163); (auch für die analogen an Inulin, Replik von REILLY und PRINGSHEIM 266); Näh. § 371). Auch das Acetat soll bei sehr starker Verdünnung mit Eisessig (< 0,4 %) zum Teil 1 × C_6 sein (HESS 267)). Diese angeblichen Des-aggregirungen seien hier nur nochmals eben zur Beschreibung des Glykogens als solchem angeführt, über ihren zweifelhaften Wert und die sehr fragliche Berechtigung kryoskopischer Bestimmungen haben wir ja mehrfach, z. B. § 371 berichtet.

Die Kettenlänge wird von HAWORTH 261), 268) sogar als noch kürzer angegeben, als für Stärke, resp. Amylopectin, wahrscheinlich nicht viel über 12. Es gilt dies natur-

258) ***M. Samec c.s.***, Compos. du glycogène. C. R., **176**, 1419 (1923). — 259) ***M. Sahyun, C. L. Alsberg***, Liver glycogen etc. Jl. of Biol. Chem., **89**, 33 (1930). — 259a) ***H. G. Bungenberg de Jong, P. v. d. Linde***, Coacervate sols etc. (Glykogen) Proc. Roy. Ac. Amsterdam 38, 419 (1935); BPh 88, 339. — 260) ***H. Pringsheim, M. Lassmann***, Inulin und Glykogen. Ber. Chem. Ges., **55**, 1409 (1922). — 261) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, J. I. Webb***, Glycogen. Jl. of Chem. Soc. **1929**, 2480. — 262) ***W. S. Reich***, Glycogène. — Triacétate du glycogène. C. R., **194**, 2141, **195**, 1029 (1932). — 263) ***R. O. Herzog, W. S. Reich***, Verh. von Polysacch, in Lösungen. Ber. Chem. Ges., **62**, 495. (1929). — 264) ***L. Schmid, E. Ludwig, K. Pietsch***, Kryosk. Mol. Gew. Best. . . . an Glykogen Monh. Chem., **49**, 118 (1928). — 265) ***E. Berner***, Vermeintl. Depolymeris. des Inulins. Ber. Chem. Ges., **63**, 1356 (1930). — 266) ***J. Reilly, H. Pringsheim, P. P. O'Donovan***, Glykogen. Ber. Chem. Ges., **63**, 1093, 2636, 3210 (1930). — 267) ***K. Hess, R. Stahn***, Kryoskop. Verh. von Glykogenacetat. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **455**, 115 (1927). S.A. — 268) ***W. N. Haworth, E. G. V. Percival***, Mol. Struct. of glycogen. Jl. of Chem. Soc. **1932**, 2277.

gemäß nur für das chemisch aus der Zelle mit gewaltsamen Mitteln (meist Kochen mit konz. Kalilauge) herauspräparirte Glykogen, das, wie wir unten sehen werden, durchaus nicht dem genuinen Zell-glykogen entsprechen muß.

Enzymtypisch verhält sich Gl. gegen die beiden Amylasen genau wie Amylopectin. Es bleiben also an seiner Struktur ebenso alle Rätsel hängen wie an diesem; insbesondere die Frage, ob die Behauptungen, daß beiden eine Drei-Zucker-Struktur zu grunde liegt, anstelle der Zwei-Zucker-Struktur der Amylosen, gegenüber den Annahmen völliger chemischer Identität aller Stärke-arten und des Aufbaus aus reinen Maltose-Ketten aufrecht erhalten werden können. Dies ist alles eingehend erörtert worden. Nur das Eine sei hier nochmals wiederholt (§ 366a), daß grade der biologische Abbau des Glykogens eines der stärksten Argumente gegen die Theorie der reinen Maltose-Ketten und für die Existenz alloiomorpher Zucker in den Ketten ist (vgl. a. GOTTSCHALK **269)**). Denn man kann es als beinahe sicher ansehen, daß beim Abbau des Glykogens in seiner eindeutigsten Form (im Muskel; in der Leber sind die Verhältnisse verwickelter) keine normalen Zucker entstehen, da der Muskel im Insulinmangel diese nicht verwerten kann, wohl aber ohne jegliche Störung die Abbauprodukte des Glykogens; und weil ferner das Extrakt aus Muskel ebensowenig Glucose angreift, wohl aber wieder sein eigenes Glykogen nach amylatischer Spaltung. Dagegen sind Angaben, daß auch isolirte Amylase aus Muskel sehr sonderbare Wirkungen auf Gl. haben soll (Bildung eines Trisaccharids (l. c. 119)) noch unsicher (vgl. § 406).

Bindung des Phosphors im Glykogen. Wie auch in manchen Amylopectinen (vgl. SAMEC, l. c. 230), aber in viel höherem Maße, ist das P des Gl. nicht einfach als Amylo-phosphat gebunden, sondern viel fester, und an Stickstoff. Der viel höhere P-gehalt des Glykogen-sols ist bereits erwähnt (l. c. 258). TAYLOR **270)** fand, daß dialysirtes Muskel- und Lebergl. ca. 0,02 % P enthalten (nach der Darstellung mit konz. KOH). Dieser ist zum Hauptteil ganz fest gebunden an einen stickstoffhaltigen Rest. Das Verhältnis N/P blieb auch nach der electrophoretischen Fractionirung stets das gleiche. — REICH (l. c. 262) kam zu einem anderen Resultat. — Diese Angaben weisen also auch auf die Glykogen-Protein-Symplexe, auf die wir nun eingehen wollen.

§ 372a. Biologische Stärke-Protein-Symplexe; künstliche Adsorbate. Es ist bereits § 372 mitgeteilt worden, daß SAMEC (l. c. 224—227) bei seinen Studien über die verschiedenen Amylopectine auf biologische Komplexe gestossen ist, bei denen Amylo-PhS fest an Proteine gebunden auftritt. Sie finden sich hauptsächlich in Samen, fehlen aber auch in den Erythrokörpern aus Kartoffeln nicht. Die Komplexe sind recht resistent gegen verd. Säuren, Elektrodialyse, sogar Kochen unter Druck, dagegen löst n/20 KOH die Adsorptionsbindung und läßt N-freies Amylopectin zurück. Ganz ähnliche Komplexe finden sich auch in den beständigeren Anteilen der Stärke, den sog. Amylo-cellulosen. Diese natürlich vorkommenden Komplexe, die also zunächst in Samen und Knollen aufgefunden sind, haben ohne Zweifel insofern eine biologische Bedeutung, als sie stationäre Zustände darstellen, die Reserven für den Abbau der Kohlenhydrate bilden. Denn wie wir gleich ersehen werden, können diese Adsorbate ihrerseits wieder die Amylase binden, und zwar ist diese dann — im Gegensatz zur Desmo-amylase an sich — mehr oder weniger völlig inaktiv, ebenso wenn man sie an solche Komplexe künstlich adsorbiren läßt, so daß also coagulirte Proteine die Stärkespaltung hemmen (§§ 384, 392). Auf solchen Ruhezuständen beruht sicherlich mindestens zum Teil das alte und so oft vergeblich untersuchte Problem der „fehlenden" oder inaktiven Amylase

269) ***A. Gottschalk,*** Glykogenkonst. und Diabetes-problem. Zs. exp. Med., **50,** 42 (1926). — 270) ***T. C. Taylor, J. J. Mc Bride,*** Phosph. in glycogen. Jl. Amer. Chem. Soc., **53,** 3436 (1931).

der Samen; im übrigen ist die Bindung der Amylase an sich in den Samen etc. in Verbindung mit ihrer Inaktivität bereits im H.W. S. 707/8 erörtert worden (*l. c. 371, 386, 387*); weit. s. § 394.

Ähnliche Symplexbildungen finden aber auch am Glykogen in den Tierzellen statt, die WILLSTÄTTER und ROHDEWALD **271)** genauer untersucht haben. Sie haben den Begriff des **Desmoglykogens** aufgestellt in Anlehnung an die Desmo-Enzyme als Inbegriff der Zellfermente, die nicht nur mechanisch abgesperrt sind wie die Saccharase der Hefen, sondern chemisch an das Protoplasma gebunden (§ 376).

Das Problem der Bindung des Gl. in den Zellen ist alt, bereits von PAUL EHRLICH (1883) ventilirt worden, der eine verschiedenartige Bindung in den verschiedenen Zelltypen annahm, um die stark schwankende Jodreaktion (§ 372) zu erklären. PFLÜGER (1904) kam aber zu einer Verneinung, weil nach dem damaligen Stande des Wissens eine „chemische" Bindung noch etwas durchaus anderes war, als diese physikalisch-chemische Adsorptionsbindung. Daß Glykogen willkürlich an Proteine adsorbirt werden kann, ist inzwischen festgestellt worden (s. u.). PRZYLECKI c. s. **282)** hatte auch bereits die Verteilung zwischen Sol und Gel an Leberbrei untersucht.

WILLSTÄTTER untersuchte die Verteilung von löslichem (Lyo-) und Desmo-glykogen mit zwei Methoden, die beide jeweilig dieselben Werte ergaben: Kurzes Erhitzen mit Wasser (15—30 Min.) und Ausziehen mit 2 %-iger Trichlor-essigsäure bei 0° und ph = 2,4. Es zeigte sich bei Leber, daß die Verteilung der beiden Fraktionen vom Glykogenreichtum des Organs abhängt: glykogenreiche Lebern enthalten viel oder alles in Lyo-Form, glykogenarme hauptsächlich Desmo-glykogen (schon von PRZYLECKI **282)** gefunden). Es gibt Übergänge zwischen beiden Formen (schwer ausziehbare Anteile). Freilegung der Desmo-Anteile durch Proteinasen gelingt, aber schwierig. Auch die Lyoanteile sind nicht etwa reines Glykogen, sondern noch Protein-Komplexe, die bei glykogenreicher Leber bis über 80 % Glykogen enthalten; bei glykogenarmer Leber enthalten sie nur 8—36 % Glykogen, sehr häufig um 25 % herum. Muskel und Leukocyten verhalten sich wie ziemlich glykogenarme Leber. Nach PRZYLECKI **272)** ist das Glykogen in den Zellen hauptsächlich an Globuline, ferner auch an Lipide (l. c. 290) verankert; im Muskel an Myosin **(285)**. Dieses Glykogeno-Myosin fand MYSTKOWSKI **286a)** auch im Froschmuskel; es ist schwer zerlegbar durch Wasser wie durch Amylasen.

Es sei hier nur kurz erwähnt, weil wir darauf erst im Allgemeinen Teil im Zusammenhang werden eingehen können, daß WILLSTÄTTER an diesen „Verbindungen" des Glykogens mit Proteinen, wie sie in den Desmoglykogenen vorliegen, den Begriff der **Symplexe** entwickelt hat, von dem wir schon mehrfach Gebrauch gemacht haben. Es handelt sich hier nicht um einfache gemeinsame Ausfällungen zweier Kolloide, sondern um wahre chemische Verbindungen, sowohl bei den noch in Proteinbindung extrahirten Lyo- wie bei den nur mit Proteinasen oder konz. Alkali aufschließbaren Desmo-formen. Auch bei den Lyo-formen herrschen bestimmte Zahlenreaktionen vor, und Anteile, die im Überschuß vorhanden sind, bleiben sozusagen frei. WILLSTÄTTER hält sie unter diesen Umständen auch nicht für einfache „Adsorbate", sondern für wahre Verbindungen, die auf die Nebenvalenzen der Proteine zu beziehen sind. Er möchte aber andererseits die Einordnung in den Begriff der „Komplexverbindungen" vermeiden, weil diesen durch A. WERNER eine ganz bestimmte Natur zugeordnet ist, die auf der Koordinationszahl und der Bildung neuer komplexer Ionen beruht. Für diese neue

---

271) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Zustand des Glykogens in der Leber etc. Zs. phys. Chem., 225, 103 (1934). S.A. — 272) ***St. J. v. Przylecki, R. Majmin,*** Polysaccharoproteide II. Bioch. Zs., 271, 168 (1934). S.A.

Gruppe von Verbindungen, die aus der Anziehung durch Restaffinitäten aus hochmolekularen oder selbst schon komplexen Verbindungen entstehen, wird nun der Name Symplex vorgeschlagen. Es brauchen nicht nur organische Stoffe zu reagiren; so rechnet W. auch die Bindungen der Enzyme, die selbst schon Symplexe sind, an anorganische Stoffe wie Tonerde zu den Symplexen. Die Bindung eines einfacheren Stoffes in einem Symplex kann erhebliche Verschiebungen seiner chemischen Wirksamkeit hervorrufen, von denen uns hier am meisten interessirt die Steigerung des spezifischen Reaktionsvermögens, wie dies bei den Enzymen grundlegend wichtig ist. W. nennt weiter: Änderung der Löslichkeit, resp. Peptisirbarkeit, der optischen Eigenschaften (so bei den Flavinen), der Beständigkeit, der Giftigkeit (Toxine etc.), äußere Reaktionen, z. B. Farbreaktionen, wozu also grade hier die verschiedene Jodreaktion des Glykogens je nach seiner Bindungsform gehört. Der Sinn dieser neuen Definition liegt in der Hauptsache darin, aus dem immer noch etwas chaotischen Gebiet der „Adsorptionsverbindungen", die nicht aus Fahrlässigkeit, sondern der Natur der Dinge nach bisher verschiedene Erscheinungsformen unter sich begreifen, die sich erstrecken von der beinahe reinen „physikalischen" Adsorption bis zu beinahe echten Hauptvalenzbindungen, ein bestimmtes und biochemisch sehr wichtiges Gebiet herauszuschneiden und exakter zu definiren, bei dem annähernd stöchiometrische Verhältnisse der Bindung infolge von Nebenvalenzen auftreten.

Zu diesen Symplex-bildungen gehören also nach W. die Verbindungen zwischen Glykogen und Protein in den Zellen, die löslichen wie unlöslichen. Es gehören aber zweifellos auch die von SAMEC gefundenen Verbindungen der Stärke mit Proteinen dazu; WILLSTÄTTER weist noch darauf ausdrücklich hin, daß die mit dem Kleber der Samen verbundenen Anteile der Stärke, die sich leicht vom Rest der Samenstärke, aber schwer vom Protein trennen lassen, ebenfalls solche Symplexe sind.

Mit der Eigenart der Glykogenbindung in den verschiedenen Zelltypen und der damit verbundenen Bindung der Amylase an die jeweiligen Symplexe könnte ein Befund von HAYASHI 273) zusammenhängen, daß jede tierische Organamylase ihr zelleigenes Glykogen am wirksamsten angreift.

Künstliche Herstellung solcher Symplexe. Daß Stärke und Glykogen zur Adsorption an Proteine neigen, ist lange bekannt. Eine ausgedehnte Bearbeitung dieser Probleme hat v. PRZYLECKI c.s. vorgenommen, über die er selbst im Zusammenhang mit anschließenden Fragen ausführlich berichtet hat (274).

Auch BANCROFT 275) hat die Adsorption von Glykogen an Proteine beschrieben und bringt sie mit einer Reversibilität der Reaktion Glykogen $\rightleftarrows$ Milchsäure in Verbindung. Das Protein soll besonders bei Anwesenheit von O_2 mehr Glykogen aus dem Gleichgewicht herausnehmen und dadurch die Synthese fördern („Erklärung" der PASTEUR-MEYERHOF'schen Reaktion).

Die Arbeiten der Schule v. PRZYLECKI verfolgen vor Allem das Ziel, das Verhalten der intracellulären Amylasen gegenüber diesen Symplexen von Polyose + Protein zu untersuchen; im allgemeinen wird durch gleichzeitige Bindung von Polyose und Enzym an Proteine die Fermentwirkung eben in dem Maaße gehemmt, wie durch die Symplexbindung die Polyose nicht mehr frei ist, sie wird sozusagen durch die Bindung vor der Enzymwirkung geschützt. Darauf, sowie auf die Bedeutung dieser Inaktivirung

---

273) ***T. Hayashi.*** Ferm. study on various kinds of glycogen etc. Jap. Jl. Gastroent., **4**, 209 (1932); BPh **72**, 162. — 274) ***St. J. v. Przylecki,*** Intracell. Regul. der Enzymreaktionen etc. Erg. Enzymf. IV, 111, Leipzig 1935. S.A. — 275) ***W. D. Bancroft, G. Bancroft,*** Glycogen metabolism. Proc. Acad. Nat. Sci. Philad., **16**, 651 (1930).

der Amylase in der Symplexbindung resp. durch Proteine überhaupt, kommen wir §§ 384, 392 zurück.

Im Gegensatz zu WILLSTÄTTER, der versucht, seine Symplexe einheitlich zu definiren als durch ausgesprochen chemische Nebenvalenz-Bindungen charakterisirte Gebilde, und sie dadurch zu trennen von den durch Hauptvalenzen resp. koordinative Valenzen über komplexe Ionen entstandenen Verbindungen einerseits, den rein dispersoid-chemisch zu betrachtenden gegenseitigen Ausflockungen und „Adsorptions-verbindungen" andererseits, bemüht sich PRZYLECKI, die von ihm beobachteten Erscheinungsformen noch weiter zu trennen, was nur künstlich neue unscharfe Grenzen und Übergangs-schwierigkeiten hervorruft. Er unterscheidet heteropolare, salzartige Verbindungen (Nucleoproteide, Verbindung Stärke-Ovalbumin unterhalb des isoel. P. des Proteins), Hauptvalenz-verbindungen (?), Nebenvalenzverbindungen (Myosin-Stärke), und durch „apolare Gruppen hervorgerufene Verbindungen" (Lipoproteide u. dgl.), die besonders labil sind. Die Verhältniszahlen zwischen E (Protein) und P (Polyose) variiren in diesen Symplexen sehr stark, z. B. P von 1—60 (**285**). — Auch Dreikomponentensysteme P-E-Nucl. S. und P-E-Lipoid konnten erhalten werden, über letztere s. u.

Im Einzelnen sei noch ganz kurz über die Befunde der Schule PRZYLECKI berichtet. Sie gehen zurück auf die Beobachtung (**276**), daß Stärke und Glykogen an Caseinogen, koagulirtes Muskel- und Lebergewebe gebunden werden. Die Bindung wird durch blosses Verdünnen vermindert, ebenso durch kapillaraktive Stoffe (Propanol, Butanol). Bindung von Stärke etc. an koag. Ovalbumin (**277**) am kleinsten beim isoel. P. Die Ladung vermindernde Ionen setzen auch die Bindung herab. Dextrine binden sich dagegen unabhängig vom ph. Bindung der Stärke reversibel > isoel. P. Auch in Solen Bindung, am besten oberhalb ph = 4,7. Die Bindung ist chemisch, aber wahrscheinlich nicht heteropolar.

Bindung von Stärke, besonders Amylopectin, an verschiedene N-haltige Stoffe (**278**): nicht gequollene Stärke bindet sich überhaupt nicht; Amylopectin an Asparagin, Guanidin, Kreatin, Guanin, Pepton, Protein, nicht Glykokoll, Alanin, Harnsäure. Größe der Bindung abhängig von der Konz. beider Komponenten. Minimum ph = 5,0—6,0, bei Protein sauer > alkalisch.

Pepton, Asparagin, Kreatin nur sauer. Bei einfachen Stoffen wahrscheinlich heteropolare Bindung, da aber auch Amylose dieselben Stoffe bindet, muß hier eine andere Bindungsart angenommen werden (?); bei den Proteinen etc. kommen verschiedenartige Bindungen in Frage. — Weitere theoretische Betrachtungen **279**); keine homoiopolare Hauptvalenzbindung; ferner Versuche mit Isotrihexosan-PICTET und P-haltigen KH; wahrscheinlich heteropolar, bei Amylose Nebenvalenzkräfte, unabhängig von der Ionisation; indessen ist doch bei ph < 5 auch eine salzartige Bindung der Amylose möglich (**280**) (VII) Untersuchungen an Drei-Komponentensystemen, z. B. Ovalbumin-Hb-Amylopectin (**280**) (VIII). Bindung von Stärke an Casein und Globulin (**281**). Bindung vom Protein abhängig, sowohl qualitativ wie quantitativ. Bei Casein wenig abhängig vom ph, alkalisch > bei 4,8.

Salzzusatz vermindert. Globulin bindet bei Salzabwesenheit nur sauer bis 5,5, bei Anwesenheit von Salz Verminderung < 5,0, aber auch Bindung > 5,0. Irreversible Bindung, da unabhängig vom Verdünnen. Ovalbumin, Eierklar wieder anders — Natürliche Bindung von Glykogen an Leberproteine, Verteilung zwischen Sol und Gel (**282**) (s. o.). — Weitere Untersuchung von Polysaccharoproteiden (**283**). Änderung der optischen Drehung gegenüber

276) ***St. J. v. Przylecki, J. Wójcik,*** Structure and enzyme action. Bioch. Jl., **22**, 34, 1302 (1928), **24**, 179 (1930). — 277) ***St. J. v. Przylecki, R. Majmin,*** Bind. der Biokoll. I, II. Bioch. Zs., **240**, 98 (1931). — 278) ***St. J. v. Przylecki, S. Dobrowolska,*** Bind. der Biokoll. IV. ebd., **245**, 388 (1932). S.A. — 279) ***St. J. v. Przylecki, M. Z. Grynberg,*** Bind. der Biokoll. VI. ebd., **248**, 16 (1932). S.A. — 280) ***Dies.,*** dass. VII, VIII. ebd., **251**, 248, **256**, 75 (1932). — 281) ***St. Bartuszek.*** Bind. der Biokoll. IX. ebd., **253**, 279 (1932). S.A. — 282) ***St. J. v. Przylecki, Wl. Bialek,*** Bind. der Biokoll. X. ebd., **253**, 288 (1933). S. A. — 283) ***St. J. v. Przylecki, E. Mystkowski, R. Niklewski,*** Bindung der Biokoll. XIX. ebd., **262**, 260 (1932).

einfacher Mischung, am geringsten beim isoel. P.; Salze vermindern, ebenso ist die nephelometrische Trübung geringer als die Summe bei den Komponenten, stärkste Aufhellung wieder beim isoel. P.; Viscositätsmessungen ergeben nicht viel, Versuch theoretischer Deutung verschiedener Bindungsformen **288a**).

Denaturirte Proteine (**284**). Albumin nur Stärke, und nur $<$ des isoel. P.; Salze verhindern. Globuline auch Dextrine, Salze hemmen $<$ isoel. P.; $>$ isoel. P. Adsorption nur bei Gegenwart von Salzen, Ca, Mg $>$ Na, K. $<$ isoel. Punkt bei Stärke salzartige, $>$ bei Stärke koordinative Bindung, bei Dextrinen immer. Die Bindung hängt sehr stark von der Vorbehandlung des Proteins ab, getrocknete adsorbiren garnicht, erst nach Kochen. Bei Proteinmischungen ergeben die verschiedenen Gestaltungen der Oberfläche verwickelte Verhältnisse.

Bindung an Myosin des Muskels (**285**) ist die Ursache, weshalb dort der größte Teil des Glykogens im Brei zurückbleibt und nicht in Lösung geht. Ebenso wird von Myosin zugesetzte Stärke adsorbirt. Verbindung ist auch im Solzustand beständig, sehr fest, in weitem ph-Bereich existirend; enthält 5—10 % Glykogen. Myogen (albuminähnlich) bindet nicht $>$ isoel. P. Clupein (**286**) bindet sich an Stärke, Glykogen, Dextrin, wahrscheinlich durch Vermittlung des Arginins. Bei ph = 9 fallen die Symplexe aus der vermischten Lösung aus. Auch Amine binden direkt, ebenso Guanidin (**287**). Aus Versuchen mit Tyrosin, sowie an Seidenfibroin und Seidenpepton (**288**) geht hervor, daß neben Arginin auch Tyrosin wichtig ist.

Auch an **Fett** ließ sich eine Adsorption nachweisen. Horowicz **289**) fand sie für Stärke an Olivenöl; Przylecki u. Majmin **290**) für Glykogen und Dextrine an Öltropfen bei Anwesenheit von Globulin und Lipoiden in Ringer-lösung, also unter ähnlichen Bedingungen wie im Cytoplasma. Sie ist bei reinem Fett sehr geringfügig, wird durch Lecithin erheblich verstärkt, wobei sowohl Vergrösserung der Oberfläche wie auch eine direkte Wirkung der polaren Gruppen im Lecithin mitwirken; Globulin + Lecithin verstärken noch mehr, da Globulin sich selbst an die Fettkugeln bindet und dann seinerseits das Polysaccharid, Glykogen wie Dextrine; die PhS des Glykogens spielt also keine Rolle. Das Glykogen sitzt in der Aussenschicht an der Grenzfläche gegen Wasser. Es werden aus 1 %-iger Glykogenlösung bis zu 80 % gebunden. Cholesterin und freie Fettsäuren wirken nicht. Auch diese eigenartigen Symplexbildungen Globulin — Fett — Lecithin — Polyose spielen sicherlich bei der intracellulären Amylasewirkung eine Rolle.

6) Schema des enzymatischen Abbaus.

§ 373. Wollen wir nun aus allen diesen Erörterungen über den Bau der Stärke und die bei den verschiedenen Verfahren des Abbaus entstehenden Produkte Schlüsse ziehen auf das, was uns hier eigentlich am meisten interessirt, nämlich in welcher Weise sich denn nun der Abbau durch die Amylasen vollzieht, so können wir nicht viel sagen, was über die spärlichen Andeutungen im H.W. S. 664 hinausgeht. Das dort angegebene Moreau-Sameo'sche Schema bleibt im Großen in Kraft und sehr viel im Einzelnen hinzuzufügen haben wir auch nicht.

Besser gesagt, es ist wieder in Kraft getreten, nachdem die Epoche der kleinen Grundkörper als überwunden gelten kann. Solange man annahm, daß die Stärke nur aus Biose-Anhydriden besteht, war die Rolle der diastatischen Fermente in der Hauptsache darauf beschränkt, die Nebenvalenzbindungen zwischen diesen Anhydriden zu lösen, dadurch aus dem großen Aggregat immer wieder kleinere Stücke herauszuschlagen, bis schließ-

---

284) ***St. J. v. Przylecki, R. Majmin,*** Polysaccharoproteide II. ebd., **271,** 168 (1934). S.A. — 285) ***Dies.,*** Verbind. Myosin-Polysacch. ebd., **278,** 262 (1934). S.A. — 286) ***Dies.,*** Polysaccharoclupeine. ebd., **277,** 420 (1935). S.A. — 286a) ***E. M. Mystkowski c.s.,*** Zustand des Glykogens im Muskel. Bioch. Zs. **281,** 231 (1935). — 287) ***St. J. v. Przylecki,*** Dextrinoguanidin. ebd., **277,** 424 (1935). — 288) ***St. J. v. Przylecki c.s.,*** Chem. Gruppen der Proteine, die Affin. zu Polysacch. besitzen. ebd., **277,** 416, **280,** 92, 96 (1935). — 288a) ***St. J. v. Przylecki c.s.,*** Sole von Polysacchar.-proteiden. Koll. Zs. **71,** 325 (1935). BPh **88,** 340. — 289) ***Z. Horowicz,*** Bind. der Biokoll. XIV, Adsorpt. von Stärke etc. Bioch. Zs., **257,** 344 (1933). — 290) ***St. J. v. Przylecki, R. Majmin,*** Adsorpt. von Polysacch. an Fett etc. ebd., **271,** 174 (1934). S.A.

lich die Anhydride selbst freigelegt waren; und dann mußte nur noch die eine Sauerstoffbrücke im Maltose-Anhydrid gelöst werden, um endgiltig zu Maltose zu gelangen. Ob dieser letzte Schritt nun durch dieselbe Amylase katalysirt würde oder ob ein eigenes definitiv Maltose bildendes Ferment in der Diastase vorhanden sei, blieb offen; das Letzte war eigentlich wahrscheinlicher, da es sich um einen chemischen Vorgang ganz anderer Art gehandelt hätte. Demgemäß habe ich selbst schon im H.W. und dann besonders im Lehrbuch der Enzyme die Frage nach der Existenz rein „desaggregirender" Enzyme zur Diskussion gestellt.

Diese Frage braucht nicht mehr erörtert zu werden; mit der Theorie der reinen Desaggregation der Stärke beim Abbau sind auch die desaggregirenden Enzyme gefallen. Wenn wir irgend etwas in diesem ungeheuer verwickelten Gebiet mit Sicherheit sagen können, so ist es dies, daß der allererste Akt der Stärkespaltung bereits eine rein chemische hydrolytische Reaktion ist: eine Aufspaltung von Hauptvalenzen in den Ketten, eine Zerlegung von Glykosidbindungen mit Freisetzung von „Carbonylen", d.h. reduzirenden Gruppen an den C_1-Atomen, die eben vorher glykosidisch gebunden waren.

Wir wollen hier von dem Verhalten der P-haltigen Stärke-abarten zunächst ganz absehen, um die Sachlage zu vereinfachen. Bei diesen tritt nach Waldschmidt-Leitz (l. c. 239a) unter der Wirkung einer relativ spezifischen Amylo-phosphatase nicht nur die Abspaltung der gesamten PhS ein (Näh. § 379), sondern auch sofort ein erheblicher Abfall der Viscosität, zu deuten also als Verkleinerung der Molate, sowie ebenfalls sofort Reduktion ohne Bildung von Maltose. Zurück bleiben „Dextrine" mit etwa 36 Glucosen. Was hier vor sich geht, ist noch nicht klar. Entweder wird durch die Abspaltung der PhS nur eine vorher abgeschirmte reduzirende Gruppe frei; oder die PhS hat vorher mehrere Ketten miteinander verbunden (§ 372), so daß mit ihrer Abspaltung schon ein chemischer Zerfall auftritt.

Nun könnte allerdings der allererste Beginn der Reduktion auch bereits am nicht verkürzten Stärkemolekül auftreten, also ohne Lösung einer glykosidischen Bindung. Denn wenn es sich tatsächlich um eine ganz normale Kette von Glucosen in 1,4-Bindung, also Maltosen handelt, müßte die letzte Maltose ein freies Ende, eben ein Carbonyl in der üblichen Form eines Halb-acetals (Lactolring nach Ohle) haben, das wie jeder freie Zucker reduzirt. Und wenn im Sinne von Haworth die Kette nur aus etwa 24 Gliedern besteht, so müßte diese Reduktion auch analytisch nachweisbar sein. Stärke reduzirt aber überhaupt nicht. Das wäre analytisch nur zu erklären, wenn sie nach Staudinger viele hundert Maltosen in einer Kette enthielte bei einem wahren Molgewicht von über 100.000; denn dann würde die eine reduzirende Gruppe analytisch verschwinden. Tatsächlich haben Haworth und ebenso Freudenberg (§ 366) diese Frage ventilirt und neigen dazu anzunehmen, daß diese eine letzte Gruppe eben nicht frei ist, sondern irgendwie anhydrisch gebunden, vielleicht in Form des Lävoglucosans. Ob nun aber etwa der allererste Akt des Angriffes der Stärke die Öffnung dieses Anhydridringes ist, ob vielleicht gar dafür ein besonderes Enzym vorhanden ist, davon haben wir nicht die geringste Vorstellung. Es kann so sein, es ist aber ebensogut möglich, daß das Enzym des ersten Angriffes gleich irgendwo in den Ketten ansetzt und kleinere Bruchstücke abspaltet. Wie klein oder groß diese Bruchstücke sind, wissen wir wieder nicht; es steht diese Frage mit der weiteren im Zusammenhang, ob etwa die Aufspaltung der Stärke sich regelmäßig derart vollzieht, daß immer nur die Endgruppe als Maltose abgespalten wird, worauf wir gleich zurückkommen werden.

Diese beiden Fragen sind vorerst nebensächlich: sowohl, ob etwa das anhydrische Ende zuerst geöffnet wird, wie die, ob nur jeweilig eine Maltose abgespalten wird.

Jedenfalls also tritt von Anfang an eine Hydrolyse, eine Verkleinerung von Ketten ein.

Und das ist die Voraussetzung der Des-aggregation, die sich dann ganz automatisch und ohne jegliche besondere enzymatische Katalyse vollzieht, weil sie sich vollziehen muß. In dem Maße, wie sich die Ketten rein strukturell in ihrer Länge verkleinern, verkleinern sich symbat damit, wahrscheinlich sogar ziemlich streng proportional damit ihre intermolekularen Kräfte. Es tritt also ein doppelter Zerfall ein: erstens verkürzen sich die Ketten an sich, es würden also auch bei erhalten gebliebenen intermolekularen Kräften bereits kleinere Aggregate entstehen, und zweitens vereinigen sich viel weniger der verkürzten Ketten zu einem wesentlich verkleinerten Molat. Je weiter die Verkürzung fortschreitet, desto mehr erlöschen die intermolekularen Anziehungen; schon im Achroodextrin-stadium scheinen sie kaum noch irgendwie erheblich zu sein, um dann beim Erscheinen der freien Maltosen ganz aufzuhören. Wir bedürfen also in keinem der beiden zur Diskussion stehenden Fälle eigener desaggregirender Enzyme: sind ohnehin nur Strukturketten vorhanden, so kommen sie nicht in Frage; und sind kürzere Strukturketten erst zum Molat geballt, so brauchen wir sie im Sinne des eben Gesagten auch nicht.

Dieser Mechanismus des doppelt beschleunigten Zerfalles unter dem Einfluß der diastatischen Enzyme läßt es verstehen, daß der Zerfall der Molate sich mit so ausserordentlicher Geschwindigkeit vollzieht. Bereits in einer halben Stunde kann das Molatgewicht auf den vierten Teil gesunken sein, und gleichzeitig treten erhebliche Reduktionswerte auf.

Als Beispiel seien einige Zahlen aus einer Tabelle von Sameo (l. c. 5, S. 451) herangezogen. Er diastasirte eine Kartoffelstärke in 1 %-iger Lösung bei 50°. Anfang: Molatgewicht 117.000. Nach 3′ nur noch 91,4 % kolloider Rest, M.G. 106.000. Nach 30′ 54,5 Rest mit M.G. 26.500; nach 1 h 30,4 mit 18.900, nach 2 h 22,1 mit 11.400. Jodfarbe des koll. Restes stets dunkelblau, des Dialysats nach 3′ noch ungefärbt, nach 30′ blauviolett, nach 1 h violett, nach 2 h gelb. (Achroodextrinstadium). Reduction je 100 g. Substanz schon nach 3′ 15,84; el. Leitfähigkeit schon gestiegen. Nach 30′ bei blauer Jodreaktion Reduction 42,24; nach 1 h (blauviolett) 68,64; nach 2 h (weinrot) 91,52. Nach 6 h war der koll. Rest nur noch 6 %, Mol. G. 6500, Gemisch kaum noch gefärbt, Reduktion 133,7.

Anfangs gehen Abnahme des Molatgewichtes und Verkleinerung der Menge des kolloiden Restes, resp. Zunahme der dialysablen Substanz fast genau parallel; bei etwa halber Menge des koll. Restes beginnt dieser schneller abzunehmen als sein Molatgewicht, d. h. auch der nach Abspaltung eines Bruchstückes verbleibende Rest wird teilweise dialysabel. Die Geschwindigkeit des Abbaues nimmt von Molatgew. 10.000 an stark ab, es reichern sich also Abbaustufen von 6—9000 an; aus der Zunahme der Reduktion läßt sich schließen, daß inzwischen andere — wohl kleinere — Aggregate weiter abgebaut werden. Diese zeitweise Beständigkeit von Erythrodextrinen hatte bereits Biltz (H.W. S. 654, *l. c. 37*) beobachtet. Gleichzeitig mit der Abnahme des Molatgew. sinken die Viscosität und die optische Drehung (letztere nach anfänglichem Steigen). Vgl. dazu die Angaben über ebenfalls greifbare Einzelstufen beim diastatischen Abbau von Brintzinger (l. c. 58), gemessen an dem Dialysen-Koefficienten.

Daraus geht hervor, daß der diastatische Abbau der Kartoffelstärke über Amylodextrine (blau) und Erythrodextrine (rotviolett) zu den Achroodextrinen verläuft, wobei alle diese Phasen durch andere chemische und physikochemische Merkmale deutlich zu kennzeichnen sind. Damit kehren wir also zu dem im H.W. S. 665 gegebenen Moreau'schen Schema zurück.

Fraglich aber bleibt dabei ein wichtiger Punkt. Moreau hatte sich den Abbau so vorgestellt, daß gleich im Anfang Zucker gebildet wird, also als erster Akt Stärke ⟶ Amylodextrin +

Zucker anzusehen ist. EFFRONT 291) hat diese Idee weiter schematisirt bis zu der Vorstellung, daß der gesamte Abbau derart verläuft, daß immer aus einer Stufe eine Maltose frei wird und ein nicht reducirendes Dextrin zurückbleibt. Diese Auslegung ist sicher nicht richtig: es ist nicht angängig, die Gesamtreduktion auf endgiltig abgespaltene Maltose zu beziehen, zweifellos reduciren zum mindesten die niederen Dextrine auch an sich durch freie Carbonyle an den Enden (§ 369). Dies gilt jedenfalls qualitativ; eine sichere Beziehung zwischen der Kettenlänge und der Reduction der Dextrine ist nicht zu gewinnen; wahrscheinlich liegt eben ein Teil der Dextrine auch in derselben nicht reducirenden Form vor, wie die Stärke selbst, nämlich mit anhydrisirten Enden, wofür vielleicht die Poly-amylosen das Modell darbieten (FREUDENBERG 292)). Die nicht reducirenden Dextrine haben ja von jeher eine gewisse Rolle gespielt (H.W. S. 457). — Außerdem enthalten ja die „Achroodextrine" bereits reducirende wahre Zucker wie die Amylohexaose.

Es scheint aber nach SAMEC in der ersten Phase überhaupt kein freier niederer Zucker zu entstehen, trotz vorhandener Reduction. SAMEC gibt an, daß erst nach einer Stunde, bei einem Molatgew. von ca. 20.000, violetter Jodreaktion, also im Erythrodextrinstadium vergärbarer Zucker auftritt, wobei gleichzeitig die rapide steigende Gefrierpunkts-Erniedrigung auf das Entstehen kleiner Moleküle hinweist. Der Übergang Stärke —▶ Amylodextrin liefert demnach noch keine Maltose, sondern erst die zweite Etappe Amylodextrin —▶ Erythrodextrin, und dann natürlich auch die folgenden Stufen.

Eine Deutung dieser Sachlage ist noch nicht möglich. Entweder wird beim Übergang Stärke —▶ Amylodextrin ein Stück abgespalten, das die Jodfarbe nicht stört und seinerseits reducirt, dann brauchte das Reststück, Amylodextrin, nicht zu reduciren; oder aber das Amylodextrin reducirt selbst trotz seines hohen Molatgewichtes; dann könnte man tatsächlich daran denken, daß hier im Wesentlichen vorerst nichts anderes geschehen ist, als eine Öffnung des anhydrischen Kettenendes; vielleicht ist dies eine Vorbedingung für den weiteren hydrolytischen Abbau; und dann könnte dies die Funktion eines besonderen Enzyms des ersten Angriffs der Stärke sein. Beantworten lassen sich diese Fragen bisher nicht, um so weniger als die Angaben über die Reductionskraft von isolirten Amylodextrinen verschieden sind, manchmal = Null, manchmal deutlich.

Wir stoßen also selbst dann auf nicht geringe Schwierigkeiten in der Deutung der Einzelheiten, wenn wir das Problem zunächst vereinfachen und das MOREAU-SAMEC'sche Schema als im wesentlichen richtig annehmen. Diese weitgehende Vereinfachung liegt darin, daß wir allgemein nur von „Stärke" und von „Amylase" reden. Wir lassen dabei also zunächst bewußt die bisher noch in keiner Weise überwundene Schwierigkeit bei Seite, daß es eben, auch wenn man von der Phosphorylirung ganz absieht (s.o.), nicht eine Stärke gibt, sondern mehrere, und nicht eine Amylase, sondern zwei, die von vornherein verschieden wirken (§ 379).

Wir haben eingehend behandelt, daß es in den nativen Stärken zwei Gruppen gibt, die sich zum mindesten physikochemisch unterscheiden, wahrscheinlich aber auch chemisch. Wieder zum wenigsten in der Anordnung der Hydroxyle, wenn nicht gar im eigentlichen Bau der Ketten. Und diesen beiden Gruppen sind die beiden Amylasen in der Weise zugeordnet, daß die α-Amylase auf die Amylo-gruppe eingestellt ist, die β sie vorerst intakt läßt. Der reinste Typus der α ist die Amylase des Pankreas, der β die der ungekeimten Gerste. Was aber diese offenkundige Differenzirung chemisch für den Abbau selbst bedeutet, ist bisher völlig unbekannt. Wir können noch garnicht

---

291) *J. Effront,* Autohydrol. des dextrines diast. C. R., **192,** 198 (1931). — 292) *K. Freudenberg,* Chemie der Stärke (Vortrag). Ang. Chemie **1934,** 675.

daran denken, nun etwa verschiedene Abbauschemata für α- und β-Amylase aufzustellen, und können vor allem auch noch keinen Weg ergründen zwischen der Vorliebe der α-Amylase für die Amylo-gruppirung und der Bildung von α-Maltose und der der β-Amylase zur Bildung von β-Maltose. Hier versinkt alles in den noch ungelösten Rätseln des Stärkeaufbaues selbst. Wir müssen uns also damit bescheiden, vorläufig nur ein sehr allgemein gehaltenes Bild vom Stärkeabbau zu geben.

7) Einwirkung der Diastase auf verschiedene natürliche Stärkearten.

§ 374. Die Angreifbarkeit des natürlichen Stärkekorns hängt selbstverständlich von den Einzelheiten seiner Struktur ab. Inwieweit hier rein chemische Unterschiede in der Substanz der äußeren Hüllen, etwa Kieselsäure-Ester (Amylo-cellulosen oder dgl.) oder nur ein die Enzymresistenz vergrößernder höherer Ballungszustand vorherschen, inwieweit ferner die Angreifbarkeit von den natürlichen Symplexen mit Proteinen abhängt, ist generell noch nicht geklärt. Es seien hier nur einige neuere Befunde wiedergegeben. Bei roher Stärke scheint es überhaupt nicht zu einer Bindung des Enzyms zu kommen.

Nach WALTON **293)** wird Mais-Stärke von Pankreas-Amylase langsamer gespalten als Kartoffelstärke, es bleibt eine unlösliche, blauviolett färbende „Hemi-cellulose" zurück, die bei höherer Enzymkonz. abnimmt; die höchste Verzuckerung bei Mais beträgt 85 % Maltose. Diese Resistenz wurde nicht aufgehoben durch Autoclaviren, Gefrieren, Überführung in lösliche Stärke. Nach ROOS **294)** wird rohe Stärke von Pankreasam. garnicht angegriffen, bei gekochter Kartoffel > Reis und Weizen.

POZERSKI **295)** hat wieder die Speichel-wirkung (Mensch) auf rohe Kartoffelstärke untersucht. Sie ist an sich fast gleich Null, wird aber durch feines Verreiben befördert. — Pankreassaft (Hund) wirkt auf rohe Stärke nicht ein, Zerreiben oder Behandeln mit HCl macht die Stärke teilweise spaltbar **(296)**. POZERSKI hat schon beim Zerreiben an sich einen geringfügigen Abbau gefunden; LÜERS **297)** fand selbst bei feinster Zermalmung bis zur Peptisirung und Verkleinerung der Molate keine Spur eines wahrhaften Abbaus. — Malzamylase-MERCK greift nach SYM **298)** unverletzte Stärkekörner nicht an; aus zerriebenen geht etwas Stärke in Lösung, und nur dieser Anteil wird angegriffen. Angriff verschiedener Reis-Sorten durch Taka BADU **299)**: abgebrühter > sonnengetrockneter, polirter > unpolirter; verschiedene Varietäten verschieden.

---

293) ***J. H. Walton, H. R. Dittmar,*** Hydrol. of corn-starch by commercial pancreatin. Jl. of Biol. Chem., **70,** 713 (1926). — 294) ***J. Roos, C. Romijn,*** Digestib. of some species of amylum etc. Arch. Néerl. de phys., **19,** 392 (1934); BPh **84,** 648; vgl. ***C. Romijn,*** Pankreasamyl. etc. Ned. Tijdschr. Gen. **1933,** 3724. — 295) ***E. Pozerski,*** Dig. salivaire de l'amidon cru. Soc. Biol., **96,** 1394 (1927). — 296) ***Ders.,*** Dig. de l'amidon cru par le suc pancr. ebd., **98,** 1196 (1928). — 297) ***H. Lüers, R. Lechner,*** Mech. Zertrümm. von Stärke etc. Ws. Brau. **50,** 9 (1933). S.A. — 298) ***E. A. Sym,*** Einfl. des koll. Zust. der Stärke auf . . . Amylolyse. Bioch. Zs., **251,** 116 (1932). S.A. — 299) ***K. P. Badu c. s.,*** Enz. digest. of rice starch. Ind. Jl. Med. Res. **22,** 759 (1935). BPh **88,** 361.

B. Darstellung und Eigenschaften der Amylasen.

VORBEMERKUNG.

§ 375. Bei diesem und den folgenden Abschnitten stehen wir vor einem Dilemma, das in der Fermentforschung nicht selten ist. Da wir nämlich nun endgiltig wissen, daß es zwei Typen von Amylasen gibt, so sollte man nun daran gehen, diese in der Beschreibung auch äußerlich ebenso zu trennen, wie wir dies selbstverständlich für die verschiedenen Enzyme unter den Holosidasen etc. getan haben. Aber war dies schon dort nicht voll durchführbar, weil wir bei vielen Enzymwirkungen immer noch nicht wissen, ob sie verschiedenen Fermenten zuzuschreiben sind, so besonders beim „Emulsin", so geht es hier bei den Amylasen vorläufig noch garnicht. Es gibt zwar schon eine Methode, beide Amylasen auch präparativ zu trennen, aber sie ist ganz neu und bisher vereinzelt geblieben, eben nur bestimmt, diese beiden Enzymabarten näher zu charakterisiren. Sonst sind alle Fortschritte in der präparativen Darstellung immer noch der „Amylase" als Gesamtbegriff gewidmet, ebenso beinahe alle Verfahren der Messung ihrer Wirksamkeit, der Beeinflussung durch äußere Faktoren, die Untersuchung ihrer biologischen Bedeutung etc. Es kann dies auch garnicht anders sein, da bisher alle Methoden der Wirkungsmessung, auf denen ja alle sonstigen Erkenntnisse chemischer oder biologischer Art beruhen, bisher für beide Amylasen dieselben sind und sein müssen, weil sie ja dieselbe Endwirkung haben: Bildung von Maltose aus Stärke oder Glykogen; und weil fast alle Präparate von „Diastase" eben beide Arten von Amylase, α wie β enthalten.

Eine weitere Komplikation in der Beschreibung der Abbaufragen tritt dadurch ein, daß man auch die Wirkung des Fermentes Amylo-phosphatase noch nicht abtrennen kann, das ebenfalls in allen Diastasen enthalten ist. Waldschmidt-Leitz hat neuerdings gezeigt (§ 379, l. c. 84), daß dieses Ferment nicht nur, wie man aus seiner unvollkommenen Kenntnis heraus (S. 116) wußte, Phosphorsäure aus den Amylopectinen etc. abspaltet, sondern daß dabei gleichzeitig reduzirende Gruppen freigelegt werden, sowie eine erhebliche Herabsetzung der Viscosität eintritt. Damit schieben sich dieses Ferment selbst und seine Wirkungen überall in die Abbaufragen mit hinein und es ist vorläufig unmöglich, diese Dinge säuberlich zu trennen. So ist z. B. die seit langer Zeit offene Frage eines nur „verflüssigenden" Enzyms von dieser nicht zu scheiden, da es aller Wahrscheinlichkeit nach kein anderes derart wirkendes Enzym an sich gibt, als eben die Amylophosphatase; die „Verflüssigung", bedarf wohl in keinem Fall einer besonderen enzymatischen Katalyse, sie ist einfach als Folge der Verkleinerung der Moleküle und damit Herabsetzung der intermolekularen Kräfte zu betrachten. Wir können also bisher nicht anders vorgehen wie im H.W. Wir behandeln das Thema Amylasen zusammen und weisen bei jeder gegebenen Gelegenheit darauf hin, um welche A. es sich handelt. Daß wir ferner einen besonderen Abschnitt einführen, in dem über die Trennung und Charakterisirung der verschiedenen Abarten gehandelt wird, ist selbstverständlich.

1) Darstellung.

Die Methodik der Gewinnung gereinigter und hochwertiger Diastase-präparate hat an sich keine principiellen Umwälzungen erfahren. Wesentlich neu sind eigentlich nur die Studien Willstätters über die verschiedenartige Bindung der Enzyme in den

Zellen, also über Lyo- und Desmo-amylasen, die natürlich auch hier auf die Darstellungsmethoden an sich zurückwirken müssen; auf diese kommen wir gesondert zurück. Eingehende Darstellung der Methodik bis 1928 (präparative und analytische Methodik) für Phyto-amylasen von LÜERS, Zoo-amylasen von WALDSCHMIDT-LEITZ im H.W. Bd. III, S. 872, resp. 885. Weitere Angaben bei ZIESE 1). — Konservirung natürlicher Enzyme (Speichel, Pankreas) durch Filtration durch Porzellanfilter und Einfrieren BOLDYREFF 2).

Zoo-Amylasen. Die Darstellung hochwertiger Präparate aus Pankreas hat durch WILLSTÄTTER c. s. 3, 4) und SHERMAN c. s. 5, 6) einen vorläufigen Abschluß gefunden (H.W. S. 670, sowie Bd. III, S. 894).

Glycerol-Extrakt der getrockneten Drüse. Verdünnen mit Wasser fällt amylasefreien Niederschlag. Entfernen der Lipase mit Al-hydroxyd-β, des Trypsins mit Kaolin in schwach essigsaurer Lösung (ph = 5). Reinigung durch Adsorption an Tonerde in stark alkoholischer Lösung (> 50 %), Elution mit Ammon-phosphat. — SHERMAN c. s. 5, 6) haben ihre frühere Methode (*l. c. 110*) verbessert, indem sie vor der Fällung mit Alkohol-Aether ebenfalls erst in 50%iger alkohol. Lösung an Al-hydroxyd adsorbiren (ph = 7,3), mit 0,015 m. NaOH eluiren. Hochwirksame Präparate, eiweißhaltig (s. u.). Eiweißfreie Präparate durch Fällung der Eluate mit Aceton WALDSCHMIDT-LEITZ 7).

Für Speichel und Leber liegen präparative Fortschritte nicht vor. Leber enthält sehr wenig, noch dazu sehr unbeständige Amylase, nur 1 : 1000 gegenüber Pankreas, 1 : 50 gegen Blut (§ 404). Hier ist man über Gewinnung von Rohextrakten (Wasser, Glycerol) und allenfalls Dialyse (6 fache Wirkungssteigerung, aber 50 % Verlust) noch nicht hinausgekommen.

Mit der Frage der Reindarstellung ist natürlich die Frage nach der chemischen Zusammensetzung der hochaktiven Präparate eng verknüpft. Die diesbezüglichen Diskussionen über die Frage der Proteinnatur der Amylase zwischen SHERMAN und der Schule WILLSTÄTTER gehen weiter. WILLSTÄTTER c. s. hatten ihre hochgereinigte Pankreas-amylase zwar noch kohlenhydrathaltig, aber eiweißfrei befunden. SHERMAN 5) lehnt dies ab, da bei der Darstellung große Verluste eintreten und bei der Dialyse wesentliche Anteile des Enzyms weggehen. Das nach wesentlich verbesserter Methode von ihnen (6) dargestellte Präparat war wieder proteinhaltig. Dagegen gelangte WALDSCHMIDT-LEITZ 7) nach Abtrennung von Lipase und Trypsin wie oben, dann dreimal Tonerde Cγ bei ph = 7 und Eisenhydroxyd bei ph = 5 durch Fällung mit Aceton zu einem absolut eiweißfreien Präparat (negativ: Millon, Ninhydrin, Biuret, Molisch) mit 75 % Ausbeute.

Beispiel für die Darstellung eiweißfreier Amylase. a) Tonerdeadsorption bei ph = 7. 71 ccm enzymatisch einheitliche Amylaselösung, mit 9,70 Am.-E. (k = 0,0137) wurden bei neutraler Reaktion der Einwirkung von 6,0 ccm Tonerde $C\gamma$ (= 51 mg Al_2O_3), darauf von 3,0 ccm der Tonerde (= 25,5 mg Al_2O_3) unterworfen, sodann nach Zusatz von 96%igem Alkohol bis zu einem Alkoholgehalte von 20% nochmals mit 3,0 ccm der Tonerde behandelt; die in der Zentrifuge abgetrennte Adsorptionsmutterlauge enthielt in 88 ccm noch 9,76 Am.-E., d. i. 99% vom Enzym.

b) Eisenadsorption bei ph = 5. 88 ccm dieser Amylaselösung, mit n-Essigsäure auf ph = 5

---

1) ***W. Ziese,*** Fermentative Methodik. Handb. der Pflanzen-analyse, IV, 907 (Berlin 1933). S.A. — 2) ***W. N. Boldyreff,*** Natural dry dig. juices etc. Am. Jl. Phys., **109,** 12 (1934); BPh **84,** 587. — 3) ***R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, A. R. F. Hesse,*** Pankreasamylase. Zs. Phys. Chem., **126,** 143 (1923). S.A. — 4) ***Dies.,*** Adsorpt. Verhalten der Pankreasamyl. ebd., **142,** 14 (1925). S.A. — 5) ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, M. Adams,*** Enz. purific. etc. Pancreas-amyl. Jl. Amer. Chem. Soc., **48,** 2947 (1926). S.A. — 6) ***Dies.,*** Furth. exper. with pancr. amyl. Jl. of biol. Chem., **88,** 295 (1930). S.A. — 7) ***E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel,*** Chem. Natur der Pankreasamyl. Zs. phys. Chem., **204,** 197 (1932). S.A.

gebracht und mit 20 ccm Wasser verdünnt, wurden mit 4,0 ccm gealterter Eisenhydroxydsuspension (= 140 mg Fe_2O_3) versetzt; die rasch mit der Zentrifuge getrennte und neutralisirte Adsorptionsrestlösung (105 ccm) enthielt dann noch 7,30 Am.-E., d. i. 75% von der Amylase in der Ausgangslösung.

c) Fällung mit Aceton. Die Mutterlauge der Eisenadsorption (105 ccm) wurde unter vermindertem Druck bei einer Temperatur von 18—22° auf ein Volumen von 40 ccm eingeengt; Nun fällte man die eingeengte Lösung mit 80 ccm Aceton und löste den in der Zentrifuge abgetrennten und mit 66%igem Aceton gewaschenen Niederschlag in 20 ccm Wasser wieder auf. Die wäßrige Lösung enthielt dann noch 3,49 Am.-E., d.i. 36% vom Amylasegehalt der Ausgangslösung.

Malzamylase. Eine wirkliche Reinigung des Enzyms in modernem Sinne ist noch nicht gelungen. Es ist anscheinend sehr fest an größere Symplexe, wohl wieder die Polyose-Protein-Symplexe (§ 272a) verankert. Bisher beschränken sich die meisten Verfahren von vornherein nur darauf, gut wirksame Präparate zu gewinnen. Über die Methodik s. bei LÜERS im H.W. Bd. III, S. 872.

Verbesserung der älteren Verfahren durch LÜERS **8)**. Adsorption an koll. Al-Hydroxyd, Elution durch Phosphat bei ph = 7,38. Bestes Präparat Fz = 93 = 190.000 alte LINTNER-Einheiten. Weitere mehr praktische Verfahren: SABALITSCHKA **9)** adsorbirt aus Malzextrakt mit Kaolin bei ph = 4,5, Elution mit Phosphat. 17-fache Wirkungssteigerung, aber 30—40 % Verlust. WEIDENHAGEN **10)** fällt mit Tannin. Lösen des Hauptteils des Tannins in Aceton, Ablösen mit aq. dest. 50-60-fache Reinigung, Am.-Wert ca. 1,0. — Durch Ultrafiltration gelang eine gewisse Reinigung SNELL **10a)**. Mit Glykol vorbehandelte Nitrocellulose-Filter; die Adsorption ist je nach dem Glykolgehalt des Filters verschieden groß. Wirkungs-Steigerung des nicht durchgegangenen Anteils auf das Dreifache; auch das Filtrat gab noch Eiweiß-reaktionen. Elektrodialyse erzielt nach LÜERS **11)** eine Steigerung der verzuckernden Kraft bis auf das Zehnfache, während die verflüssigende garnicht zunimmt.

Trennung von der Maltase: durch Kaolin-adsorption PRINGSHEIM **12)**, einfacheres Verfahren **13)**: Malz mit 87 %igem Glycerol extrahiren, Verdünnen mit Wasser, filtriren, einengen, Dialyse. Präp. frei von Maltase. Eine wirksamere Am. erhält man nach **(14)** durch Adsorption an Al-hydroxyd B bei ph = 5, Elution mit Ammon.-Phosphat bei 7,0.

Trennung von Phosphatase und Lipase durch Tonerde C_γ bei ph = 3,8 **15)**.

Dem Ziele einer wirklichen **Reinigung** näher kommt ein Verfahren von GLIMM **16)**. Wenn man Am. steril in einem geschlossenen Gefäß altern läßt, so löst sich das Enzym unter Erhaltenbleiben der Aktivität teilweise von dem Kolloidsystem ab. Die so freigelegte Am. kann dann durch Tierkohle ganz losgelöst werden, weitere Reinigung durch Kaolin etc. Dieses Präparat hat bei einem Amylasewert von 5,8 nur noch 3,8 % N, kein Molisch, schwach Ninhydrin.

SHERMAN c. s. haben ihre Versuche zur weitgehenden Reinigung fortgesetzt. Letzte Methode **(17)**: fraktionirte Fällung mit Ammonsulfat, Auswahl der aktivsten Fraktion, Dia-

---

8) ***H. Lüers, E. Sellner***, Rein. der Malzamylase. Ws. Brau., 42, H. 17—19 (1925). S.A. — 9) ***Th. Sabalitschka, R. Weidlich***, Adsorpt. der Amylase etc. Bioch. Zs., **188**, 290 (1927). S.A. — 10) ***R. Weidenhagen***, Reinig. pflanzl. Amyl. Zs. V. D. Zuck., **83**, 505 (1933). — 10a) ***C. T. Snell***, Ultrafiltr. of malt-amylase. Jl. of biol. Chem., **104**, 43 (1934). — 11) ***H. Lüers, R. Lechner***, Elektrodial. von Amylaselös. Ws. Brau., **50**, 49 (1933). S.A. — 12) ***H. Pringsheim c. s.***, Trenn. der Ferm. des Gerstenmalzes. Bioch. Zs., **164**, 117 (1925). — 13) ***H. Pringsheim, E. Thilo***, Trenn. der Ferm. des Gerstenmalzes III. ebd., **203**, 99 (1928). — 13a) ***E. Thilo***, Ferm. Stud. an Polysacch. Diss. Berlin 1931; BPh **64**, 569. — 14) ***H. Borchardt, H. Pringsheim***, Malzamyl. u. Kartoffelamyl. Bioch. Zs., **239**, 193 (1931). S.A. — 15) ***M. Samec, E. Waldschmidt-Leitz***, Enzym. Spaltbark. der Amylo- und Erythrokörper. Zs. phys. Chem., **203**, 16 (1931). S.A. — 16) ***E. Glimm, W. Sommer***, Rein. der Malzamylase. Bioch. Zs., **188**, 290 (1927). — 17) ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, S. E. Doebbeling***, Purific. of malt amyl. Jl. of biol. Chem., **104**, 501 (1934). S.A.

lyse, erneute Fraktionirung, bis keine weitere Steigerung der Aktivität mehr zu erzielen, Dialyse, frakt. Fällung mit Alkohol, Fällung mit Alkohol-Aether. Aktivität im SHERMAN-Maß ca. 400. Das hochgereinigte Enzym besteht analytisch immer noch aus Eiweiß. Nach der Wirkung handelt es sich ganz vorwiegend um β-Amylase (Saccharogen-Am.).

Sonstige **Phyto-amylasen:** NAYLOR **18)** stellte Am. aus Weizen und Roggen nach der älteren SHERMAN-Methode dar und fand sie der Malzamylase sehr ähnlich.

Eiweißfreie Am. aus *Ipomoea batatas* erhielt auf einem sehr einfachen Wege GIRI **19), 20).** Wasserextraktion, Alkoholfällung, Dialyse, Adsorption an Al-Hydroxyd-gel. Fast reine β-Amylase. Aus *Sorghum* eiweißfreie Am. mit starker Molisch-Reaktion NARAYANAMURTI (l. c. 110).

Reinigung der **Taka-amylase** und zwar ausgehend vom Pilz *Aspergillus oryzae* selbst, nicht von Handelspräparaten nach NISHIMURA **21):** Züchtung auf Weizenkleie, Ausziehen mit Wasser, Adsorpt. an koll. Tonerde bei ph = 5, Elution mit Phosphat. Messung der Wirkung nach $Fz = \frac{k\ g\ \text{Stärke}}{g\ \text{Enzym}}$. Roh Fz bis 0,4, nach zweimal Adsorpt. 5—6, nach vorherigem Konzentriren des Roh-extraktes im Vakuum 7—9. Noch besser erst Acetonfällung, dann Adsorption. Fz bis 17, aber größere Verluste. Bestes Ergebnis durch Ausfällen des ersten Eluats mit bas. Bleiacetat, wieder Tonerde, wieder Bleiacetat, zweimal: Fz = 23—26 = 71000 LINTNER-Einheiten. Das Reinpräp. enthielt 27 % KH und gab alle Proteinreaktionen.

Eine **Trennung der beiden Amylasen** wird durch die üblichen Verfahren nicht erreicht, resp. man hat früher nicht darauf geachtet. Daß SHERMAN's reinste Malzam. (17) etwa reine β ist, ist erwähnt. Dagegen scheint bei den WILLSTÄTTER'schen Reinpräparaten eine Trennung nicht vor sich zu gehen (H.W. S. 677), oder man hat nicht darauf geachtet, da ja die tierischen Am. an sich vorwiegend α-Amylasen sind. Auf die erfolgreichen neuen Verfahren kommen wir § 379 zurück.

2) Eigenschaften.

§ 376. Die Frage, ob Protein oder nicht, haben wir § 375 vorweggenommen, da sie mit der Verbesserung der Darstellungsmethoden zusammenhängt. Zoo-amylase ist jedenfalls kein Protein; für die Phyto-amylase ist es durchaus möglich, daß das zum System gehörige Pheron ein wahres Protein sein muß. Über die biologische Verankerung der Amylasen s. unten bei Lyo- und Desmolipasen.

Kristallisirte Pankreasamylase: CALDWELL c. s. **22)** aus wäss. alkoh. Lösung. Sehr labil, sehr geringe Mengen. Auf die Frage nach der **Ampholyt-natur** der Am. können wir hier nicht genauer eingehen. Aus seinen Studien über die Salzwirkungen auf tierische Am. bei verschiedenem ph (§ 387) folgert MYRBÄCK **23),** daß die ph-Aktiv.-Kurven die Dissociations-restkurven eines Ampholyten sind; die sich anlagernden Salze verschieben beide Äste der Kurve. Wirksam ist also wie bei der Saccharase der undissociirte Anteil, das ph-Opt. liegt beim isoel. Punkt. Die Dissoc.-Konst. sind für salzfreie Am. $K_a = 10^{-6,3}$, $K_b = 10^{-8,4}$; für Cl-Amylase $10^{-8,1}$ resp. $10^{-8,6}$. Auch die Taka-amylase hat den isoel. Punkt beim opt. ph = 4,3 — 4,5 (SHERMAN **24)**), nach GOODWIN **25)** soll sie aber ein Anion sein.

18) ***N. M. Naylor, M. Spencer, M. House,*** Amylase from germin. wheat and rye. Jl. Amer. Chem. Soc., **47,** 3037 (1925). — 19) ***K. V. Giri,*** Amyl. from Batata. Jl. Ind. Chem. Soc., **11,** 339 (1934). — 20) ***Ders.,*** Amylase der Batate. Bioch. Zs., **275,** 106 (1934). — 21) ***S. Nishimura,*** Rein. der Amyl. aus Asp. oryzae. Jl. Agr. Chem. Soc. Japan, **2,** 129 (1926). S.A.; Z. K. der Takadiast. Chemie der Zelle, **12,** 202 (1925); BPh **34,** 415. — 22) ***M. L. Caldwell, L. E. Booher, H. C. Sherman,*** Crystall. amylase. Sci., **74,** 37 (1931). S.A. — 23) ***K. Myrbäck,*** Verbind. einiger Enz. mit inaktivir. Stoffen II. Zs. phys. Chem., **159,** 1 (1926). S.A. — 24) ***H. C. Sherman, A. W. Thomas, M. L. Caldwell,*** Isoel. P. of malt amylase. Jl. Amer. Chem. Soc., **46,** 1711 (1924). S.A. — 25) ***T. C. Goodwin, J. C. Hanger,*** Ionic nature of amylase. Proc. Soc. Exp. Biol., **23,** 261 (1926); BPh **36,** 422.

BOEKESTEIN 26) folgert aus Adsorptionsversuchen, daß rohe Pankreasam. bei höherem ph noch saure Eigenschaften hat, gereinigte nicht mehr; in Wirklichkeit aber sind mit fortschreitender Reinigung immer basischere Adsorbentia nötig, gereinigte Am. geht nicht mehr an Tonerde (l. c. 3), vgl. § 384.

Haltbarkeit: bei Speichelamylase nach EGE 27) stark abnehmend mit der Verdünnung, ziemlich genau proportional, aber nur in der ersten Zeit; nach längerem Stehen, wenn der größte Teil des Enzyms zerstört ist, kehrt sich das Verhalten um: die Zerstörung nimmt mit zunehmender Verdünnung ab. Dialyse ändert nichts. Es wird ein kolloider Stabilisator angenommen, der allmählich durch die Zerstörung des Enzyms relativ angereichert wird. Proteine können ihn nur teilweise ersetzen. Er soll — neben NaCl — besonders wichtig sein für die Erhaltung der Amylase im Magen (§ 400). Auch die NaCl-Konz. ist bei gleichem ph (6, 8) wichtig für die Beständigkeit, optimal > 0,3 %. Das Stabilitätsoptimum (vgl. § 385) liegt beim opt. ph, ca. 6,5; bei 7,4 und 5,9 schon auf die Hälfte gesunken, dann schnelle Abnahme nach beiden Seiten (EGE 28)). Die Zerstörung verläuft monomolecular. Pankreasamylase geht bei 25° in 2 h zu 50 %, in 4 h zu 66 % zugrunde, bei 40 % in 1 h (29).

Eine Wirkungsverschiebung zu gunsten etwa der α- oder β-Amylase tritt bei 24 h Stehen nicht ein (SABALITSCHKA 30)). — Über die Haltbarkeit der Harn-Am. s. NÖRBY 31); sie ähnelt in jeder Beziehung der Speichel-Amylase.

Lyo- und Desmo-amylasen. Daß in den verschiedenen Zelltypen die Am. in verschiedenen Zuständen auftreten, daß sie insbesondere vielfach nicht frei, sondern an höhere Komplexe der Zelle, an „Protoplasma" mehr oder minder fest gebunden sein können, ist schon früher beobachtet und bereits im H.W. berichtet worden, s. besonders die Ansichten von LESSER betr. die Am. der Leber (S. 738) und die Speichel-amylase, bei der LESSER 31a) auch eine Bindung an Strukturbestandteile der Drüsenzelle annahm; die Sekretion setzt erst eine „Freilegung des Enzyms" voraus, die recht allmählich vonstatten geht. Auch in neuerer Zeit ist diese Frage mehrfach behandelt worden, so von v. PRZYLECKI im Anschluß an seine Studien über die Bindung von Polyosen an die Zellproteine und der Amylase wiederum an diese größeren Symplexe (§ 372a). v. PRZYLECKI 32) gab an, daß Amylase bei der Adsorption an Proteine ihre Wirksamkeit nicht notwendig einbüßen muß (§§ 384, 392) und ferner, daß in Übereinstimmung mit LESSER die Am. etwa der Leber zu 90 % adsorbirt sein muß.

Aber erst WILLSTÄTTER hat diese Frage an verschiedenen Zelltypen systematisch bearbeitet und auch die chemischen Unterschiede zwischen freien und gebundenen Amylasen näher untersucht. Wir sind den von WILLSTÄTTER *) 33—36) neu geschaffenen

*) Ich zitire hier genauer nur die speciell die Amylasen betr. Arbeiten WILLSTÄTTERS. Die anderen parallel laufenden über Lyo- und Desmoenzyme werden bei den betr. Kapp. gegeben (s. §§ 315, 325). Hier nur der Publikationsort für die erst später zu besprechenden Arbeiten. Zs. phys. Chem., 204, 181, 208, 258 (Pepsin), 209, 32, 218, 77 (Trypsin). Die Gesamtwürdigung der Arbeiten muß dem Allg. Teil vorbehalten bleiben.

26) ***P. T. Boekestein,*** Adsorpt. von Amylase an Stärkekörner. Diss. Amsterdam, 1933. Acta brev. neerland. Physiol., 2, 132 (1932). — 27) ***R. Ege, E. Oklitz,*** Haltbark. des Ptyalins etc. Bioch. Zs., 219, 422 (1930). — 28) ***R. Ege,*** Einfl. der Reakt. auf die Zerstör. des Ptyalins. ebd., 244, 243 (1932). S.A. — 29 ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, N. M. Naylor,*** Infl. of tryptophane ... upon ... pancr. amylase. Jl. Amer. Chem. Soc., 47, 1702 (1925). — 30) ***Th. Sabalitschka, C. Schulze,*** Malzamylase. Ferm.-Forsch., 8, 428 (1925). S.A. — 31) ***G. Nörby,*** Estim. and stabil. of urine amylase. C. R. Carlsberg Labor., 18, H. 7 (1931). — 31a) ***E. J. Lesser,*** Diastasesekretion I (Speicheldrüse). Bioch. Zs., 184, 125 (1927). — 32) ***St. J. v. Przylecki, H. Niedzwiecka,*** System Polysacch.-Amylase-Protein. Biochem. Jl., 22, 34 (1928). S.A. — 33) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Amylasen der Leucocyten. Zs. phys. Chem., 203, 189 (1931). S.A. 34) ***Dies.,*** Amylasen der Leukocyten II. ebd., 221, 13 (1933). S.A. — 35) ***Dies.,*** Pankreas-Amylase. ebd., 221, 202 (1933). S.A. — 36) ***Dies.,*** Amylasen der Leber und anderer Organe. ebd., 229, 255 (1934). S.A.

Begriffen der Lyo- und Desmoenzyme schon mehrfach begegnet, so bei den Lipasen, der Saccharase und der Maltase. Hier gilt es nur noch zu schildern, was WILLSTÄTTER in dieser Hinsicht an den von ihm hauptsächlich untersuchten Objekten, den Amylasen der Leukocyten und anderer tierischen Zellen beobachtet hat.

Zunächst sei das ganz Grundsätzliche kurz wiederholt. W. unterscheidet drei Abarten von Enzymen nach ihrem natürlichen Zustand in der Zelle, die nicht absolut scharf von einander getrennt sind, zwischen denen es vielmehr Übergangszustände gibt. Zwei dieser Abarten sind in der Zelle relativ frei gelöst. Unter ihnen sind wieder zu unterscheiden die Typen, die aus der Zelle ohne Weiteres in die üblichen Lösungsmittel, etwa Glycerol, hineingehen, also ganz frei löslich, Lyo-Enzyme sind. Andere sind zwar in der Zelle gelöst, aber durch „Wände" abgesperrt, die Endo-enzyme, als deren Typus wir die Saccharase der Hefen eingehend besprochen haben (§ 310). Ihnen gegenüber steht — freilich durch Übergänge mit den Endo-enzymen verbunden, s. bei Maltase (§§ 327, 328) — die Gruppe der Desmoenzyme, dadurch definirt, daß sie an „*Protoplasma chemisch gebunden*" sind (WILLSTÄTTER **37)**). Sie werden auch nicht, im Gegensatz zu den Desmo-enzymen, bei der spontanen Autolyse frei, sondern nur durch chemische Behandlung mit Säuren, Alkalien, z. T. auch durch Proteinasen; aber nie vollständig, ein Teil bleibt immer unlöslich gebunden an Komplexe der Zelle selbst, eben an ihr „Protoplasma". Und sie sind in dieser festen Bindung wirksam; dadurch unterscheiden sie sich grundlegend von den Adsorbaten an fremde Proteine, die unwirksam sind, und von den in den Zellen, so z. B. ruhenden Samen, inaktiv eingelagerten Enzymen, die erst durch Freilegung infolge der bei der Keimung auftretenden Wirkung von Proteinasen aktiv werden, wobei noch das Entstehen von specifischen Aktivatoren, hier der Amylokinase (§ 392) mitwirken kann. Dazu Weiteres § 394 und bei HESSE in Bd. IV des H.W. sowie **38)**. Bei der Klarstellung der Begriffe, und speciell für die Frage der Zwischenstufen zwischen Endo- und Desmo-enzymen, ist noch zu beachten, daß diese beiden Namen eigentlich zwei verschiedene Dinge betreffen. Endo-enzyme bezieht sich auf einen Zustand und ein Verhalten inbezug auf die Zelle, ist sozusagen ein biologischer Begriff. Desmo-enzyme sagt etwas mehr Chemisches aus: die Tatsache, daß das Enzym innerhalb oder außerhalb der Zelle durch Bindung an hochmolekulare Gebilde unlöslich in Wasser, Glycerol u. dgl. geworden ist, bei erhaltener Wirksamkeit. Ganz allgemein kann man noch sagen, daß die Zellenzyme um so mehr den Lyo-typus haben, je mehr die Zelle zu ihrer wahrhaften Sekretion bestimmt ist; so hat die Pankreas-amylase fast ganz den Lyo-typus, aber auch das Desmotrypsin des Pankreas ist relativ leicht ablösbar; ebenso wie oben erwähnt **(31a)** die Am. der Speicheldrüse. Da die Verhältnisse bei den Amylasen der Leucocyten sehr verwickelt sind, wollen wir hier ausnahmsweise den Weg gehen, die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten nacheinander wiederzugeben.

WILLSTÄTTER **33)** ging von der Beobachtung aus, daß Leukocyten, die man mit Glycerol vermischt, erhebliche Mengen Am. abgeben, wenn auch ihr Enzymvorrat damit nicht erschöpft ist, denn auch der Rückstand wirkt noch. Wenn man aber durch viel Aceton die spontane Autolyse ausschaltet, so geben sie nur sehr wenig Am. ab, und diese rührt von stets vorhandenen bereits vorher abgestorbenen, in der Autolyse begriffenen Zellen her. Jegliche Art Am. der Leukocyten, die also schnell ohne Autolyse extrahirbar ist, ist also bereits das

37) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Zustand der zuckerspalt. Enz. in der Hefezelle. ebd., **209**, 38 (1932). S.A. — 38) ***A. Hesse,*** Abbau von Stärke etc. beim Mälzen etc. Erg. Enzymf. III, 95 (1934).

Abgeschlossen: 1. 12. 35. Ber. Phys. 88, H. 7/8.

Produkt spontaner Zerfallsprozesse, die sich sehr schnell vollziehen, Zerfall wohl sicher eines Glykogen-Protein-Komplexes (§ 372a), sei es durch Proteinase oder — autokatalytisch — durch Amylase. Alles dies ist aber noch Lyo-Amylase, und zwar fand er deren zwei, α und β. Dazu kommen dann 3 oder 4 Desmo-amylasen. Von diesen beiden tritt die **β-Lyo-amylase** nur unter nicht ganz normalen Bedingungen auf, wenn die Zellen vorher mit Säure oder Alkali in Berührung gekommen waren, so bei der fraktionirten Hämolyse nach Szilard.

Diese β-Lyo-am. unterscheidet sich in keinem Merkmal von der des Pankreas. Dagegen ist die **α-Lyo-am.**, wie sie aus Frisch-leukocyten in Glycerol übergeht, markant verschieden von der β und damit des Pankreas. Sie ist absolut abhängig von der Anwesenheit von Phosphorsäure, die weniger gut durch Arsensäure ersetzt werden kann; in allen anderen Puffern ist sie überhaupt ohne Wirkung. Ferner ist sie viel labiler, durch Ca aktivirbar, und hat einen anderen opt. ph (6,2 gegen 6,8).

Die Desmo-enzyme, in feinen Suspensionen untersucht, sind zwar unter sich verschieden, bilden aber eine Gruppe und zeigen folgende Gruppen-Eigenschaften: sie sind beständiger, vom Phosphat unabhängig, und werden durch Glycerol schon in geringer Konz. gehemmt. Dieser Art sind 3 nachweisbar; daneben gibt es noch eine stärker verschiedene vierte, nicht immer, aber häufig in mit Aceton getrockneten Leuk. nachweisbare, die Phosphate braucht und von Glycerol wenig gehemmt wird; dies wäre in Analogie zur α-Lyo-am. die α-Desmo-am. und wahrscheinlich die Muttersubstanz der α-Lyo-am. Diese Komponente läßt sich durch zweimaliges Waschen mit Glycerol entfernen, wobei wahrscheinlich ein die Umwandlung in den Lyo-Zustand hemmender Stoff beseitigt wird.

Die 3 Desmo-amylasen der ersten Gruppe sind nacheinander zu gewinnen. β durch Na_2HPO_4, γ durch Papain, δ bleibt auch dann unlöslich; mit ihr bleibt stets noch Maltase erhalten. Willstätter deutet diese Verhältnisse generell wie folgt: alle Abarten sind intra vitam gebunden an einen kolloiden Komplex. Ein Teil davon zerfällt spontan durch Autolyse: Lyo-amylasen. Bei der Desmo-am. ist je ein Teil gebunden an ein pufferlösliches Protein, ein durch Papain verdauliches Protein, ein gegen Papain resistentes Gebilde, vielleicht ein Polysaccharid. — Die Tatsache, daß α-Lyo-amylase als einzige Phosphorsäure braucht, deutet darauf, daß diese im Agon selbst PhS enthält, so wie es auch für die Amino-polypeptidase gilt.

Die Desmo-enzyme sind zwar an sich aktiv, aber es ist wahrscheinlich, daß dies nur ein Bruchteil ihrer maximalen Aktivität ist: sie sind wahrscheinlich stark gehemmt. Dies ist insofern von großer Wichtigkeit, als wir hier den Übergang finden zu den Erscheinungen bei anderen Objekten, insbesondere den ruhenden Samen, wo diese vitale Bindung z. B. der α-Amyl. zur völligen Inaktivirung führt. Hier gibt es also nirgend scharfe Grenzen, auch beim Übergang vom Desmo- zu dem Lyo-zustand wird wahrscheinlich die meßbare Aktivität stark gesteigert.

In der zweiten Arbeit **(34)** ergab sich dann, daß es noch mehr Amylase-typen in den Leukocyten gibt. In Analogie mit der Maltase stellte es sich nämlich heraus, daß die erste Beobachtung, als gäben die schnell entwässerten L. garkeine Am. ab, irrig war. Sie geben tatsächlich eine Lyo-Amylase ab, die mit den zuerst beschriebenen einer Gruppe angehörigen Desmo-am. die Eigenschaft teilt, durch Glycerol völlig gehemmt zu werden. Es gibt also ein durch beide Gruppen hindurch erkennbares Merkmal: Lyo- und Desmo-am. mit oder ohne Glycerol-Hemmung. Zu diesem Merkmal tritt als zweites die Notwendigkeit oder Entbehrlichkeit des Phosphats, ebenfalls durch beide Gruppen durchgehend. Es gibt also in jeder Gruppe 4 Amylasen, die sich durch Glycerolhemmung und Phosphatunabhängigkeit je nachdem + oder — schematisch gruppiren lassen:

	Desmo	Lyo
Glycerol (a) Hemmung)	+	+
	—	—
Phosphat (b) (Unabhängigkeit)	+	+
	—	—

Demgemäß gibt es 4 Lyo-am. und 4 Gruppen von Desmo-am.; denn bei diesen kann noch die verschiedene Abstufung der Löslichkeit wie oben bei β, γ, δ dazu treten, die aber den inneren Charakter nicht ändert, da beim In-Lösungbringen dieser Untertypen der Gruppentypus unverändert bleibt. Zu jeder Desmo-am. gehört also eine durch a resp. b charakterisirte Lyo-am., deren Muttersubstanz sie ist. Es wird also eine andere Anordnung nötig, die der Reihenfolge der Abgabe entspricht.

Lyo-amylase I ist nun das aus Trocken-leucocyten in Glycerol übergehende, aber dort völlig gehemmte Enzym; es ist unabhängig von Phosphat, also + a + b. Es wird durch Wegdialysiren des Glycerols aktiv, geht aber dabei in Lyo-am. III (— a + b) über, die mit vorhandene IV wird bei der Dialyse zerstört. Typus III ist die frühere β-Am., Typus IV die frühere α. Zu Lyo I gehört Desmo I, die uns bereits bekannte Gruppe β, γ, δ, jetzt I α, β, γ genannt, alle + a + b, erhältlich nach kurzer Extraktion von Frisch-leuc. mit Glycerol.

Lyo II, Glycerol-hemmung, Phosphat notwendig, + a — b, ist mit I zusammen in den dialysirten Glycerol-auszügen dadurch nachweisbar, daß in Phosphat-Puffer die Wirkung gesteigert ist. Sie fehlt häufig, entsteht vielleicht erst sekundär aus I. Auf demselben Wege läßt sich bisweilen Desmo II im Rückstand nachweisen (Glycerol-hemmung, stärkere Wirkung bei Phosphat.).

Lyo III, Glycerol hemmt nicht, Phosphat gleichgiltig, — a + b; von Pankreas-am. nicht zu unterscheiden, die alte β-Lyo-am. Man erhält sie aus Trockenleuc. oder durch Umwandlung von I bei der Dialyse. Ist sie von vornherein vorhanden, was nicht immer der Fall ist, dann findet man auch im Rückstand die dazugehörige Desmo III.

Lyo IV, Glycerol hemmt nicht, Phosphat notwendig — a — b; früher Lyo α genannt, findet sich meist nur beim Auszug aus Frisch-Leuk. (Autolyse, s. o.), kommt aber auch gelegentlich in Aceton-Präparaten vor, ist also unter besonderen physiologischen Bedingungen schon vorgebildet. Sehr unbeständig, geht bei Dialyse zu grunde. Die entspr. Desmo IV ist die frühere α, deren Vorkommen noch nicht gesichert war; sie ist aber jetzt zweifellos nachgewiesen; ebenfalls sehr unbeständig.

Die leucocytären Am. sind α-Am. Die Jodreaktion, Umschlag von blau nach blau-violett, kann schon eintreten, ehe überhaupt Maltose nachweisbar ist.

Pankreasamylase. Wie erwähnt, ist die Pankr.-am. fast ganz eine Lyo-amylase, wie WILLSTÄTTER c. s. schon 1923 (*l. c. 111*) gefunden haben; es bleibt nach **35)** nur ein kleiner Rest übrig, zahlenmäßig von 2—7 %; jedoch ist dies ein Mindestwert von Desmo-am., da die Drüse Kathepsin in aktivem Zustande enthält, ein Abbau also kaum zu vermeiden ist. Bei häufigerem Waschen mit Glycerol geht immer wieder etwas Am. heraus, so daß schließlich nur noch 0,2 % als Desmo-am. zurückbleiben. Pankreas-am. wird nur wenig durch Glycerol gehemmt (2—11 %).

Auch bei **anderen Organen** finden sich die analogen Unterscheidungsmerkmale bald mehr, bald weniger deutlich; es scheinen überall Gemische der isodynamen Enzyme verschiedenen Typs vorzukommen **(36)**. Leberam. ähnelt der der Leukocyten, Muskelam. nähert sich der des Pankreas. Überall finden sich auch Desmo-amylasen, besonders im Muskel; ebenso finden sich in verschiedenem Ausmaß die Hemmung durch Glycerol und die Notwendigkeit von Phosphat. Desmo-am. aus Schweineleber kann fast reine I sein (Glycerol-hemmung, Phosphat nicht notwendig).

Es muß noch hinzugefügt werden, daß die Vorstellungen, die man sich früher über „Festhaltung" der Organ-amylasen, resp. über ihre „räumliche Trennung" vom Substrat speciell bei der Leberamylase gemacht hatte, nur wenig mit diesen neuen Befunden zu tun hatten, denn alle diese Vorstellungen bezogen sich in der Hauptsache nicht auf Desmo-amylasen, sondern viel eher auf adsorbirte Lyo-amylasen. LESSER nahm ja an, daß rein dispersoidchemische Änderungen der Oberflächen ausreichen, um die Am. freizusetzen (H.W. S. 738), ebenso bei der Speicheldrüse (l. c. 31a);

ebenso wird für die Leberam. angegeben, daß sie durch Autolyse allmählich freigelegt wird (§ 404). Das deutet also auf lockere Bindungen, allenfalls auf Endo-enzyme, nicht auf Desmo-enzyme, wenngleich man stets im Auge behalten muß, daß speciell die Grenzen in der Hinsicht schwankend sind, daß eben auch die Proteinasen der eigenen Zelle analog auf die Symplexe wirken können, wie zugesetztes Papain u. dgl.

Mit dem Problem der Desmo-amylasen verwandt, aber nicht damit identisch ist die Frage nach dem Zustand der Am. in den Samen vor und nach der Keimung, mit anderen Worten der Umstand, daß ungekeimte Samen häufig ganz oder fast ganz inaktiv sind, während bei der Keimung die Amylase auftritt, sei es durch „Entstehung" oder „Aktivirung". Dieses Problem ist seit langen Jahren bearbeitet worden (H.W. S. 707, ferner Bd. IV, S. 34 ff.); s. a. bei Hesse **38)**. Nun ist es wohl heute ziemlich sichergestellt, daß auch im ruhenden Korn schon Amylasen vorgebildet sind und diese bei der Keimung „aktivirt" werden, von der dann einsetzenden gewaltigen Vermehrung durch Neubildung natürlich abgesehen (§ 394); auch die α-Am. ist im ruhenden Gerstenkorn entgegen Ohlsson nach Waldschmidt-Leitz bereits vorhanden (§ 379). Fraglich bleibt nur, inwieweit die Aktivirung nur durch Ablösung aus der natürlichen Bindung an die Protein-Komplexe durch die Proteasen der Samen, oder auch — für α-Amylase — außerdem noch durch einen specifischen Aktivator, die Amylokinase, vollzogen wird (§ 392). Das ist an dieser Stelle ohne Belang, denn jedenfalls wirkt Lockerung der Protein-Bindung entscheidend mit. Aber „Desmo-amylasen" sind das nicht, denn sie sind ja — ganz oder beinahe — inaktiv! Auch in anderen Pflanzenzellen sind die Am. z. T. inaktivirt gebunden, so in Blättern der Zuckerrübe (Oparin, l. c. 44a). Es ist also eine andere Nuance des umfassenden Problems des „Zustandes" in der Zelle; es sind verwandte Probleme, die wieder auf der anderen Seite mit den experimentellen Befunden über Adsorption an Proteine zusammenwachsen (§ 384), sowie den natürlichen proteinartigen adsorbirenden Hemmungskörpern (Sisto-amylasen, § 392). Denn ebenso wie die eigenen Zellproteasen wirken auch zugesetzte Proteinasen desselben Typus, nämlich Papain. (Trypsin scheint anders zu wirken, es soll eine „Kinase" enthalten, § 392.) Diese Aktivirung der Samen-amylase durch Papain ist lange bekannt (H.W. S. 708, *l. c. 327, 385*) und neuerdings mehrfach bestätigt **(39—42)**; die Einzelheiten sind hier nicht von Belang.

So sei nur die letzte Angabe von Myrbäck erwähnt, daß 15 h. Papainwirkung die gesamte Amylase freilegt. Lüers **40)** bestätigt, daß tatsächlich nur vorhandene Am. freigelegt, nicht der Typus geändert wird; was z. B. aus nicht keimender Gerste aktiv freigelegt wird, ist nur β-Am., die α-Am. wirkt nach wie vor nicht, da die Amylokinase (§ 392) noch nicht vorhanden ist. Erst bei sehr langer Autolyse scheint etwas α-Am. aktivirt zu werden. Chrzaszcz **43)** bringt diese Papainwirkung mit seiner Eleuto-amylase in Verbindung (§ 392), was insofern richtig ist, als eben wohl die entstehenden Peptone die Desorption noch beschleunigen könnten, aber sicher nicht richtig, wenn er nun sozusagen eine Eleuto-amylase im Papain selbst annimmt; im übrigen fand er auch eine sehr erhebliche Verstärkung der verflüssigenden Wirkung durch Pepton, die bei Papain praktisch fehlt. Peptone wirken also anders als Papain,

---

39) ***S. Józsa, H. Gore,*** Developm. of diast. enz. of malt etc. Ind. and Eng. Chem., **24,** 95 (1932). — 40) ***H. Lüers, R. Lechner,*** Einw. von Papain auf Gerste etc. Ws. Brau, **50,** 33 (1933). S.A. — 41) ***J. Weichherz, R. Asmus,*** Enzym. Vorg. bei der keim. Gerste. Bioch. Zs., **237,** 20 (1931). — 42) ***K. Myrbäck, S. Myrbäck,*** Gersten- und Malzamylase. Bioch. Zs., **258,** 158 (1933). — 43) ***T. Chrzaszcz, J. Janicki,*** Eleuto-amylase etc. Bioch. Zs., **263,** 250 (1933), **272,** 402, **274,** 274 (1934).

nämlich aktivirend auf α-Am. Auch Elektrolyte wie NaCl lockern diese Bindungen an Zellproteine, so daß man z. B. bei Weizen und Malz das sonst z. T. festhaftende Enzym völlig freibekommt, auch Zucker wirken analog (Józsa **39**)).

Bei der Keimung wird die durch Papain zusätzlich freizulegende β-Am. immer geringer, nach 7 Tagen ist die gesamte β-Am. wasserlöslich (**42**), fast ebenso ist es für das „dextrinirende Enzym", jedoch bleibt von diesem nach Lüers **44**) immer noch ein Rest gebunden, der durch Papain freizulegen ist.

Abb. 36.
I. Verflüssigungsvermögen bei normalem Auszug.
II. do. nach Papain-Verdauung, nach **44**).

Bemerkenswert ist, daß hierbei dieselben Kurven für den Zuwachs durch Papain gefunden werden, wenn man die „verflüssigende" Wirkung nach Lintner-Sollied oder die Dextrinirung (Jodfärbung) mißt (Abb. 36, 37).

Weiteres über die Am. bei der Keimung § 394, sowie **38**).

Ähnlich wie bei den Samen ist auch die Am. in den Blättern (Zuckerrübe) nach Oparin **44a**) z. T. unwirksam an Proteine gebunden; aber eben nur ein Teil, dessen Gleichgewicht mit dem aktiven Anteil vom Milieu abhängt. Bei ph = 8 wird die gesamte Am. frei. Auch durch Zentrifugiren des Autolysats werden die Gleichgewichte gestört; Zentrifugat + Rest enthalten zusammen immer mehr Am. als das ursprüngliche Autolysat.

Abb. 37.
I. K_D bei normalem Auszug. II. K_D nach Papain-Verdauung; nach **44**)

3. Bestimmung der Wirksamkeit *).

§ 377. Zu diesen Fragen ist seit dem H.W., insbesondere den Darstellungen von Lüers und Waldschmidt-Leitz im Band III, S. 872 und 885 nur wenig zu ergänzen.

Analytische Methodik. Die Untersuchung der **Jodfärbung** wird erneut abgelehnt, da 4 verschiedene Stärkesorten nach dieser Methode Differenzen von 100 bis zu 2400 zeigen, je nachdem sie mehr oder weniger Amylo-amylosen enthalten (Chesley **45**)). Auch bei der gleichen Stärke Fehler bis zu 45 %. Empfehlung der Kupfer-Reduktion volumetrisch gemessen

---

*) Weitere Einzelangaben zur Bestimmung in Blut und Harn s. §§ 407, 408.

44) ***H. Lüers, W. Rümmler,*** Entwickl. der Amyl. während der Keimung. Ws. Brau. **50**, 297 (1933), **52**, 296 (1935). S.A. — 45) ***L. C. Chesley,*** Validity of the viscos. and Wohlgemuths methods for the determ. of amylase. Jl. of Biol. Chem., **92**, 171 (1931).

(Chesley 46)). Eine Methode zur Bestimmung kleinster Mengen Am. haben Pickford u. Dorris 47) angegeben: Einwirkung auf einen dünnen Film von Stärke-Agar, Nachfärbung mit Jod; Anwendung dieser Methode zur Unterscheidung verschiedener Sorten Stärke und verschiedener Amylasen Giri 47a). Zur Methodik der Bestimmung der Jodfärbung: Kolorimetrische Verfolgung des Überganges von Blau zu Violett in einem besonderen Apparat, besonders geeignet für kinetische Messungen (Sym 48)). Verfeinerung der klinischen Jodfarbe-Methode nach Wohlgemuth Fischer 49). Empfehlung der Wohlgemuth'schen 15-Minuten-Probe für Harn Murata 50).

Zuckerbestimmungen. Titrimetrische Bestimmung, Oxydation des Cu_2O durch Ferriammonsulfat, Titration mit $KMnO_4$ (46). Modifikation der Methode Lintner s. Harada 51). Pufferung mit saurem K-Phtalat auf bestimmten ph: Malz 5,3, Taka 5,2, Pankreas 6,0. 100 ccm 2% Stärkelösung mit 10 ccm Enzym bei 37° 30'. Titration mit Fehling'scher Lösung. Aufstellung einer empirischen Einheit, Tabelle zur Umrechnung in Lintner-Werte. Verbesserung der Barfoed'schen Methode zur Bestimmung von Glucose neben Maltose, Milchsäure anstatt Essigsäure durch Tauber 52), weitere Verbesserung durch Zusatz von Pyridin Willstätter (l. c. 36).

Klinische Mikrobestimmung in Körperflüssigkeiten Lorber 53). Gasometrische Bestimmung durch sofortige Vergärung der jeweils gebildeten Maltose Schultz 54).

Physiko-chemische Methoden. Nephelometrische Bestimmung des Glykogenabbaus durch Speichel Rona 55) (H.W. S. 675), Paechtner 56). Verbesserung der Rona'schen Methode, Mikrobestimmung mit Stufen-Photometer Krijgsman 57). Ablehnung des Glykogen als Substrat, Empfehlung eines 1 %igen gleichmäßig hergestellten Sols aus Reisstärke Remesow 57a).

Dilatometrische Messung der Zuckerbildung 58); je ein Mm. Maltose bedingt Abnahme um 3,9 cmm (59).

Viscosimetrische Methode. Diese hat heute eine erhebliche Bedeutung erlangt, da sie gestattet, den eigentlichen Abbau des Molates zu messen, unbeschadet der ja stets nur zweifelhafte Schlüsse erlaubenden Jodfärbung und des Auftretens freier Carbonyle (Reduktion). Auch sie hat den immanenten Nachteil, daß wieder die verschiedenen Ausgangsstoffe von vornherein verschiedene Viscosität haben, so Amylopectin mehr als Amylose; auch hier schwanken infolgedessen die Werte enorm: Chesley 45) fand bei seinen 4 Stärkesorten Schwankungen von 350—2100. Eine ganz besondere Bedeutung aber gewinnt die Methode für den Nachweis des ersten Angriffs auf das Molat durch das Enzym Amylophosphatase von Waldschmidt-Leitz (§ 379).

---

46) ***L. C. Chesley,*** Valid. of jod. and copper meth. for amylase. Proc. Soc. Exp. Med., **31,** 1097 (1934); BPh **83,** 198. — 47) ***G. Pickford, F. Dorris,*** Micro-meth. for . . . proteases and amyl. Sci., **1934,** II, 317. — 47a) ***K. V. Giri,*** Differ. of amylases etc. Science, **1935,** I, 343. — 48) ***E. A. Sym,*** Kolorim. Meth. zur Best. der Amylasewirk. Bioch. Zs., **253,** 1 (1932). — 49) ***O. Fischer,*** Diastase-Bestimmung. Zs. exp. Med., **86,** 258 (1933). — 50) ***M. Murata,*** Brauchbark. von Wohlgemuths 15-Min.-Diastase-Meth. D. Med. Ws., **1930,** II, 2044. — 51) ***T. Harada,*** Estim. of diast. enz. prepar. Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed., **3,** 1 (1931). — 52) ***H. Tauber, I. S. Kleiner,*** Determ. of monosacch. in the pres. of disacch. etc. Jl. of Biol. Chem., **99,** 249 (1932) S.A. — 53) ***L. Lorber,*** Mikro-Diastase-Best. Bioch. Zs., **163,** 480 (1925). — 54) ***A. S. Schultz, Qu. Landis,*** Veget. amylases. Jl. Amer. Chem. Soc., **54,** 211 (1932). — 55) ***P. Rona, C. van Eweyk,*** Neue Meth. zur Unters. der Amylase. Bioch. Zs., **149,** 174 (1924). — 56) ***J. Paechtner,*** Nephel. Unt. über Glykogenabbau. Bioch. Zs., **156,** 249 (1924). — 57) ***B. J. Krijgsman,*** Photom. Mikrobest. von Amylase u. Maltase. Zs. phys. Chem., **230,** 190 (1934). — 57a) ***J. A. Remesow,*** Nephelom. der Amylase. Arch. biol. nauk (russ.), **37,** 425 (1935), BPh **88,** 284. — 58) ***M. Sreenivasaya, B. N. Sastri,*** Dilatom. stud. in enz. act. Jl. Ind. Inst. Sci., A, **13,** 57 (1930). — 59) ***H. B. Sreerangachar c. s.,*** Dilatom. stud. in the enzymic hydrol. of polysacch. Proc. Indian Ac. Sci., **B 1,** 101 (1934); BPh **84,** 648.

Zur Ausführung viscosimetrischer Amylase-Bestimmungen: Analyse und Berechnung BROEZE 60); DAVISON 61) benutzt LINTNER-Stärke, 2—6 %, nach Autoclaviren; zu 10 ccm 0,1—0,4 ccm Amylase. Anfangsviscosität = 100, Endwert in % davon. Amylaseeinheit 20%ige Abnahme in 1 h; keine einfache Beziehung zu anderen Versuchszeiten, wohl aber bei gleicher Zeit umgekehrt proportional der Enzym-menge. — Andere Ausführungsform und Berechnung; Herstellung genau reproducirbaren Standardsubstrates in Form einer 3 % Stärkelösung, die aus einer Mischung einer viscosen und einer weniger viscosen Stärke gewonnen wird: THOMPSON c. s. 62).

Ausbau zur Präzisionsmethode, speciell für Blutserum, THOMPSON c. s. 63): Acetatpuffer, ph = 5,1; Messung der Zeit, in der eine Änderung der Viscosität um 7,5 % eintritt. Herstellung einer besonders geeigneten Stärkesuspension durch schnell laufenden Rührer JÓZSA 64). (Kritik an der Methode (65), Antwort (66)); autoclavirte Stärke in Na-Acetat THOMPSON (63), II). Modification von WILLAMAN 67): neue Pipette, andere Art der Berechnung mit dem Ausdruck *LP* = *liquefying power* (Formel § 378). Modificirtes Viscosimeter JOHNSTON u. JÓZSA 68), Einführung der Einheit „*Liquefon*", § 378, weitere methodische Einzelheiten JÓSZA u. JOHNSTON 69). Verwendung des HÖPPLER-Viscosimeters an einer betont verflüssigenden technischen Bakterien-diastase (*Superclastase*) LÜERS 69a).

CHRZASZCZ c. s. 70) haben die Methode LINTNER-SOLLIED modifizirt; Nachprüfung von 33 verschiedenen Anweisungen der Literatur ergab, daß nur 7 brauchbar sind.

Differenzirung verschiedener Amylasen. Versuche, auf analytischem Wege Unterschiede zwischen den Amylasen verschiedener Herkunft aufzufinden im Hinblick einerseits auf die Annahme verschiedener Enzyme, andererseits auf die Erkenntnis des Stärkeabbaues, sind seit altersher immer wieder gemacht worden, z. B. Verhältnis von Abnahme der Jodfärbung/Reduktion, Drehwert/Reduktion, Viscosität/Reduktion etc.

Hierzu einige neuere Arbeiten. ENGLIS c. s. 71) maßen das Verhältnis Polarisation/Reduktion (P/R) in 1%iger Stärkelösung. P/R ist für 100 % Maltose = 5,54, für 100 % Glucose = 9,04. Die Amylasen zeigen verschiedene P/R. Taka < Malz, Alfalfa einen abnorm hohen Wert. Bei Taka also entweder Bildung von reducirenden Stoffen mit noch hohem Drehwert, ähnlich dem der Stärke, oder Glucose-bildung schon von Anfang an. Bei Alfalfa umgekehrt schneller Abfall der Drehwerte ohne erhebliche Bildung freier Endgruppen (nicht reducirende Dextrine?) Bei Takadiastase ergeben Reduktion, Jodreaktion, Polarimetrie und Viscometrie ungefähr dieselben Kurven, wenn man sie als Funktion der Zeit aufträgt (MASLOW 72)).

Ebenso fand aber auch SABALITSCHKA 73) bei Malzamylasen unter Einhaltung bestimmter Bedingungen eine erstaunliche Konstanz der k-Werte für Verzuckerung (k_r) und

---

60) ***J. R. Broeze,*** Einwirk. des Ptyalins auf Stärke. Bioch. Zs., **204,** 286 (1929). S.A. — 61) ***W. C. Davison,*** Viscosim. meth. for the quant. determ. of amylase. Bull. Johns Hopkins Hosp., **37,** 281 (1925). — 62) ***W. R. Thompson c. s.,*** Viscosim. meth. of estim. enz. conc.... amylase. Jl. of gen. Phys., **15,** 1 (1931), **16,** 221, 229 (1932). — 63) ***W. R. Thompson, R. Tennant, C. H. Wies,*** Precis. method for the estim. of amyl. activ. etc. Jl. of biol. Chem., **108,** 85, **109,** 201 (1935). — 64) ***S. Józsa, H. C. Gore,*** Determ. of liquef. of malt. diast. Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed., **2,** 26 (1930). — 65) ***L. Fletcher, J. B. Westwood,*** Determ. of liquef. power of malt amylase. Jl. of Inst. Brew., **36,** 550 (1930). — 66) ***S. Józsa, H. C. Gore,*** Developm. of diast. enz. of malt etc. Ind. Eng. Chem., **24,** 95 (1932). — 67) ***J. J. Willaman, E. W. Clark, O. B. Hager,*** Mess. des Verflüss.-Vermög. von Diastase. Bioch. Zs., **258,** 94 (1933). — 68) ***W. R. Johnston, S. Józsa,*** Meth. for determ.... enz. prepar. Jl. Amer. Chem. Soc., **57,** 701 (1935). S.A. — 69) ***S. Józsa, W. R. Johnston,*** Determ. of α-amylase. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **7,** 143 (1935). S.A. — 69a) ***H. Lüers, A. Löther,*** Viscosim. Verfolg. von Enzymreakt. Ws. Brau., **52,** 49 (1935). S.A. — 70) ***T. Chrzaszcz, J. Janicki,*** Neue Meth. zur Best. des Stärke-Verflüss.-Verm. Bioch. Zs., **242,** 130, **256,** 252 (1931/2). — 71) ***D. T. Englis, G. T. Pfeiffer, J. L. Gabby,*** Polarim. red. sugar rel. of starch hydrolytic prod. etc. Jl. Amer. Chem. Soc., **53,** 1883 (1931). — 72) ***H. L. Maslow, W. C. Davison,*** Compar. of the viscos. etc. meth. for ... hydrol. of starch. Jl. of Biol. Chem., **68,** 75 (1926). — 73) ***Th. Sabalitschka, R. Weidlich,*** Best. der dextrinir. und verzuck. Wirk. der Amylase-Einh. des Dextrin. und Verzuck. Enz. Bioch. Zs., **207,** 476, **215,** 267 (1929). S.A.

Dextrinirung (k_d) (Jodreaktion). Wenn überhaupt die Kinetik der Verzuckerung „normal" verläuft, so wird der Quotient $k_r/_{k_d}$ immer gleich 1,28 ± 0,17 gefunden, auch nach Reinigung der Amylasen durch Adsorption etc. Es entspricht dies den Erfahrungen WILLSTÄTTER's, der selbst bei weit getriebener Reinigung anscheinend keine Wirkungsverschiebungen beobachtete (H.W. S. 677). Da wir einmal wissen, daß die Malzamylase beide Amylasen enthält, so ist das nur ein Beleg dafür, daß sich beide Enzymarten gegen die üblichen Reinigungsverfahren sehr gleichmäßig verhalten, und erst durch Specialmethoden getrennt werden können.

Eine Reihe von Versuchen der Differenzirung zwischen Viscositätsänderung und Reduktion an trocken erhitzter Am. (Pankreas, Soja) hat ORESTANO 74) angestellt. Zwar verlief die Temperatur-Aktivitätskurve der Abnahme der Wirkung nach trockenem Erhitzen auf hohe Temp. (> 100°) nach beiden Methoden völlig gleichmäßig bei beiden Methoden; aber die Kurven der Wirkung selbst verschieden: K_r sinkt bei Verdünnung des Enzyms proportional ab, K_v langsamer. Bei Malzamylase zeigte sich auch die Gleichheit der Abnahme nach trockenem Erhitzen; dagegen zeigt die Maltosebildung aus löslicher Stärke (nicht aus roher) Unterschiede, sie sinkt viel schneller und hört über 130° überhaupt auf. Die Angabe, daß auch nicht erhitztes Enzym auf rohe Stärke besser wirkt, als auf lösliche, macht die Ergebnisse im Ganzen sehr zweifelhaft. Auch bei der Dextrinirung wurde kein Unterschied gefunden (75); alle drei Enzyme (Pankreas, Soja, Malz) werden durch Erhitzen auf 140—150° gleichmäßig nach allen Methoden gemessen unwirksam. Rückschluß auf zwei unabhängige Prozesse aus den Temp.-Koeff. für K_v und K_r bei 6 verschiedenen Amylasen ROTINI (l. c. 82).

§ 378. Einheiten; Kinetik. Die meisten der eingeführten Einheiten sind nur im Zusammenhang mit der angewendeten Methodik zu verwerten und dienen ja auch meist nur practischen Zwecken. Das gilt ebenso für die viel benutzten älteren (LINTNER, SHERMAN etc.) wie für die neueren, s. a. § 377. Über die für vergleichende Untersuchungen und Forschungszwecke ausgearbeiteten Einheiten von WILLSTÄTTER (**A. E.** resp. **A. W.**) und v. EULER (**Sf.**) s. H.W. S. 674.

Diese Einheiten beruhen auf der Geschw. Konst. k einer monomolecularen Reaktion, lösliche Stärke als Substrat. Amylase-Einheit das 100fache derjenigen Enzymmenge, für welche die Konstante K = 0,01 ist. 0,01 A. E. bilden 46,9 mg Maltose aus 0,25 g Stärke in 12,49 Min. Amylase-Wert: Anzahl von A. E. in 0,01 g Präparat.

$Sf = \frac{k \,.\, g.\ \text{Maltose}}{g \,.\, \text{Präparat}}$. 1 A. W. = Sf × 0.0533. Andere Einheit bei LÜERS (l. c. 8):

$$Fz = \frac{k \,.\, g.\ \text{Stärke}}{g \,.\, \text{Enzym}}$$

Fz = ungefähr 2000 alte LINTNER-Einheiten. Zahlenmäßige Umrechnung auf Sf:

1000 LINTNER-Einheiten	=	26 Sf
1000 SHERMAN-Einheiten (*new scale*). .	=	38,5 Sf
1 A. W.	=	18,8 Sf

Für die Verflüssigung der Stärke, viscosimetrisch gemessen, haben WILLAMAN c. s. (l. c. 67) versucht, eine feste Einheit zu schaffen, die *liquefying power* (**L. P.**), nämlich die Stärkemenge in g, die durch 1 g Enzympräparat bei 40° in 1 h verflüssigt wird. Wenn D die proz. Abnahme der Viscosität, E mg Enzym in 3,0 ccm, so ist

$$LP = \frac{5\,000\,000}{E \,.\, \left(\frac{169}{D} - 1\right)^{1,6}}.$$

74) ***G. Orestano*** (***C. Zummo***), Fluidific. e saccharif. dell' amido etc. Boll. Soc. Ital. Biol., **5**, 346, 431 (1930), **7**, 259 (1932). — 75) ***G. Orestano***, Fluidif. e saccharif. dell' amido etc. Arch. di farm., **56**, H. 9 (1933). S.A.

Wieder eine andere Art der Berechnung schlagen für die viscosimetrische Bestimmung der α-Amylase JOHNSTON u. JÓOSA (l. c. 68) vor. Ein „*Liquefon*" ist die Menge einer α-Amylase, welche eine Standard-Stärkepaste von 25 mg Trockenstärke pro Minute unter festgelegten Bedingungen abbaut. Die Zahl der Liquefone in 1 g Präparat ergibt die Enzymkonz. Empirische Beziehung zwischen der Zahl der Liquefone in 10 ccm Lösung (L) und der Anzahl von in 1 h verflüssigten mg Stärke (S): log L = (S — 1078) × (0.000565), giltig im Bereich von 20—60 % verflüssigter Stärke.

Zur **Kinetik** hier nur in aller Kürze einige Nachträge. Es wird allgemein angenommen, daß bei gleicher Substratkonz. die Geschwindigkeit von der Enzymkonz. abhängt, zum mindesten im Anfang. Dies gilt für α- wie für β-Am. (JOHNSTON c. s., l. c. 68).

Dagegen ist eine klare Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Substratkonz. nicht zu erkennen. EADIE **76)** gibt an, daß bei einer Konz. von 0,03 % binnen 10′ keine Hydrolyse zu erkennen ist (Reduktion). Darüber ist die Abhängigkeit mit zunehmender Konz. eine logarithmische Funktion, etwa v = a + b log C (a und b Konstanten ohne theoretisches Fundament). Die ansteigende p_s-Kurve zeigt Abhängigkeit vom ph (4,3 > 6,1). Der Temp.-Koeff. hängt stark von der Substratkonz. ab, Q_{10} nimmt von 5—15° stark ab von ca. 1000 bei 0,0682 bis auf 3 bei 2,78 %. HANES **76a)** findet im Gegensatz zu EADIE keine untere Schwelle der Wirkung, vielmehr Hydrolyse schon bei 0,05 %.

Nach SYM **77)** ist die relative Zuckerbildung um so größer, je geringer die Anfangskonz. der Stärke, unabhängig von kolloidalen Änderungen der Stärke bei der Vorbehandlung. Die Abweichungen sind weder durch hemmende Spaltprodukte, noch durch die Verringerung der Konz. der Stärke zu erklären; sondern eher durch das Auftreten langsamer zerfallender Zwischenstufen. Nach SCHAEFFER **78)** (Zuckerbildung, Speichel) sinkt die zunächst sehr große R.G. in der Zeit rasch ab, durchläuft ein Minimum, erreicht ein zweites Maximum, und sinkt dann erst in logarithmischer Kurve ab. Alle diese Unregelmäßigkeiten werden durch Voll-Aktivirung (NaCl + Aminosäuren) behoben.

Bei der viscosimetrischen Festlegung der R. G. findet man ebenfalls direkte Proportionalität mit der Enzymkonz. (BROEZE **79)**). Es treten aber Abweichungen von der logarithmischen Kurve auf, die nicht auf einer Abschwächung des Enzyms beruhen.

ARTOM und ORESTANO **80, 81)** fanden verschiedene K_l (Verflüssigung) für Pankreas und Soja. Erstere folgt der logar. Kurve; letztere eher einem Zeitgesetz $K = \frac{x}{\sqrt{t}}$. Die Verzuckerung verläuft unter bestimmten Bedingungen bei beiden nach der logar. Kurve. Für den gesamten Verlauf einschl. der Einwirkung von Enzymkonz. (E) und Substratkonz. (c) kann man folgende Formeln aufstellen:

$$K_R = \frac{c}{E \cdot t} \log \frac{75}{75 - x}; \; K_l = \frac{x}{c \sqrt{E \cdot t}}.$$

Weitere Angaben über die Kinetik von 6 verschiedenen Amylasen ROTINI **82)** (Verflüssigung) und PRATOLONGO **83)** (Verzuckerung). Verflüssigung stets monomolecular, Verzuckerung ebenfalls, wenn gepuffert, bimolecular ohne Puffer (?). Ausrechnung von Temperaturkoefficienten von ca. 40° bis ca. 50°, zwischen 1,35 und 1,61; daraus Berechnung von „Aktivirungswärme" der Spaltungsreaktion" (*energia critica*) zwischen 5860 uud 9500 gcal für Verflüssigung, von 6000—13200 für Verzuckerung. Da sie für beide Prozesse verschieden, wird Unabhängigkeit angenommen. Kritische Energie der Hitzeinaktivirung (aus K_c berechnet) von 20000—34600.

---

76) ***G. S. Eadie,*** Eff. of substrate conc. on the hydrol. of starch etc. Biochem. Jl., **20**, 1016 (1926). — 76a) ***Ch. S. Hanes,*** Eff. of starch conc. upon the veloc. of hydrol. by the amyl. etc. Biochem. Jl., **26**, 1406 (1932). — 77) ***E. A. Sym,*** Einfl. des Koll. Zustandes der Stärke ... auf die Amylolyse. Bioch. Zs., **251**, 116 (1932). S.A. — 78) ***Y. Schaeffer,*** Action de l'amylase. Soc. Biol., **98**, 1491 (1928). — 79) ***J. R. Broeze,*** Einw. des Ptyalins auf Stärke. Bioch. Zs., **204**, 286 (1929). S.A. — 80) ***G. Orestano,*** Cin. della fluidif. ... enzim. dell' amido. Boll. Soc. Ital. Biol., **5**, 442 (1930). — 81) ***C. Artom, G. Orestano,*** Cin. compar. de la liquéf. et saccharif. enz. de l'amidon. Bull. Soc. Chim. Biol., **13**, 516 (1931), **14**, 1531 (1932). — 82) ***O. T. Rotini,*** Ric. sul gruppo del amilasi I. Ann. Labor. Ric. Ferm. Spallanzani, **1**, 89 (1930). — 83) ***U. Pratolongo, M. P. Allan, O. T. Rotini,*** Ric. sul gruppo del amil. II. ebd., **1**, 113 (1930).

4) Die verschiedenen Typen der Amylase.

§ 379. Das alte im H.W. S. 677 eingehend behandelte Problem der Einheitlichkeit der Amylasen hat eine Lösung gefunden: die üblichen „Diastasepräparate" sind nicht einheitlich, es gibt mehrere Amylasen. Aber die Lösung ist ganz anders ausgefallen, als man erwartet und discutirt hatte. Die Frage war dahin gestellt, ob der Stufenabbau der Stärkearten durch zwei (oder mehr) diesen Stufen entsprechende Enzyme katalysirt wird, oder durch eines, das den gesamten Abbau beherrscht. Mit anderen Worten, man diskutirte die alte Ansicht WIJSMAN's (*l. c. 155*), ob es ein dextrinbildendes Enzym „Amylase" im engeren Sinne, und ein Dextrin zu Zucker abbauendes Enzym, eine „Dextrinase" gibt. Man setzte also ohne Weiteres Stärkeverflüssigung = Abbau = Dextrinbildung, und erzeugte damit künstlich eine gewaltige Verwirrung, aus der wir im H.W. noch keinen Ausweg finden konnten.

Im Gegensatz dazu schuf man noch (besonders CHRZASZCZ (*l. c. 153, 154*)) die Vorstellung eines dritten, besonderen „verflüssigenden" Enzyms, was die Verwirrung noch mehr steigerte. Ein Enzym, das noch außer der an sich zu starker Herabsetzung der Viscosität führenden Elektrolytabspaltung durch Amylo-phosphatase **84)** besonders „verflüssigt", gibt es sehr wahrscheinlich nicht, bei jeder enzymatischen „Verflüssigung" tritt auch Abbau ein; oder richtiger gesagt, der Abbau der großen Molate führt automatisch zur stärkeren Dispergirung, eben der Verflüssigung. Auf einige Angaben betr. die Möglichkeit eines nur verflüssigenden Enzyms kommen wir unten zurück. LÜERS (l. c. 11, 44) hat vermutet, daß dies verflüssigende Enzym einfach die α-Amylase ist, fand aber zuletzt doch Differenzen zwischen Verflüssigung und Jodfärbung bei α-Am., so daß er nunmehr ebenfalls die Verflüssigung als die einfache Folge der Aufspaltungen, vor Allem eben durch die α-Am., ansieht.

Die Dinge haben sich nun prinzipiell geklärt. Es gibt drei Arten von Enzymen, die am Abbau der Stärke teilhaben, und somit in den Präparaten des Enzymkomplexes, den wir „Diastase" nennen, enthalten sind. Soweit Stärke mit Gehalt von gebundener Phosphorsäure in Frage kommt, gibt es als Enzym des ersten Angriffes eine „**Amylo-phosphatase**", die wir prinzipiell bereits S. 116 erwähnt haben, und die neuerdings WALDSCHMIDT-LEITZ **84)** in Gerste und Malz genauer untersucht und von den eigentlichen Amylasen durch auswählende Adsorption an Tonerde Cγ, dann Kaolin, getrennt hat. Ihr opt. ph ist = 5,6.

Abb. 38. Verflüssigende Wirkung der Amylophosphatase nach WALDSCHMIDT-LEITZ u. MAYER 84).

Dieses Enzym spaltet aus den P-haltigen Stärken (Stärkekleister) die gesamte Phosphorsäure ab, dabei zeigt sich eine erhebliche Abnahme der Viscosität, und

---

84) ***E. Waldschmidt-Leitz, K. Mayer***, Amylophosphatase aus Gerste. Zs. phys. Chem., **236**, 168 (1935). S.A.

zwar proportional der Enzymkonzentration. Gleichzeitig treten reducirende Gruppen auf, aber keine Maltose. Die verbleibenden Stoffe geben eine rein blaue Jodfärbung und sind leicht durch Amylasen weiter zu zerlegen; aus der Reduktion kann man auf eine Kettenlänge von ca. 36 Glucosen schließen, jedoch sind wohl diese wegen der Reduktion als Dextrine zu bezeichnenden Stoffe nicht einheitlich.

Über die Natur und die Wirkungen dieses Enzyms ist noch kein abschließendes Urteil möglich. Es spricht viel dafür, daß es wirklich nur eine Phosphatase ist; es spaltet auch, wenn auch schwächer, Glycerol-PhS, und andererseits zeigen gewöhnliche Phosphatasen (Niere) die Wirkung auf Stärkekleister, ihrerseits wieder schwächer. Danach könnte es also wohl eine der Phosphatasen mit betonter relativer Specifität, hier zur Amylo-PhS. sein. Dann würde das Enzym also tatsächlich nur die PhS. abspalten, nicht die organischen Ketten an sich verkürzen. Die Länge der verbleibenden Ketten von 36 Glucosen würde nicht dagegen sprechen, da ja HAWORTH eher noch etwas kürzere Ketten in der Stärke annimmt (§ 364). Die Abnahme der Viscosität könnte man, wenn die Beseitigung der polaren Gruppen an sich dafür nicht genügt, nach WALDSCHMIDT-LEITZ vielleicht dahin deuten, daß die PhS. mehrere Glucosid-Ketten verbindet, so daß mit ihrer Entfernung bereits ein Zerfall der Moleküle, wenn auch noch keine Verkürzung der Ketten selbst, eintritt. Die Reduktion endlich müßte man dann auf eine Umlagerung in den Zuckern, auf das Freisetzen einer vorher durch die PhS. abgeschirmten reducirenden Endgruppe beziehen. Dabei macht allerdings wieder die Tatsache Schwierigkeiten, daß die PhS. an einem C_6 stehen soll (§ 372). Andererseits ist es möglich — auch W.-L. deutet dies an —, daß dieses Enzym auch noch nicht einheitlich ist, daß darin noch das eigentliche genuine Stärke angreifende kettenlösende Enzym enthalten ist, so daß die entstehenden „Dextrine" mit ihrer Reduktion doch schon wahre Abbauprodukte wären mit stark verkürzter und geöffneter Kette, was im Sinne der sehr langen Ketten nach der Theorie von STAUDINGER das Wahrscheinlichere wäre. Das ließe sich vielleicht durch Prüfung des reinen von der üblichen β-Amylase befreiten Enzyms an Amylose oder dgl. entscheiden, — ob es nämlich auf solche P-freien Stärken überhaupt eine meßbare Wirkung hat. Jedenfalls könnte die weitere Aufklärung dieser Verhältnisse höchst wichtig werden.

Außer diesem Sonderferment der Abspaltung von PhS enthalten nun alle Arten Diastase noch zwei weitere Enzyme, die beide Amylasen im eigentlichen Sinne sind, da sie beide Stärke in ihrem organischen Gerüst angreifen und abbauen. Diese beiden Fermente haben eine sehr sonderbare Geschichte, und ihre Beziehungen zu einander und ihre beiderseitige Rolle im Stärkeabbau sind durchaus noch nicht völlig klar. Die moderne Entwicklung der seit vielen Jahren vergeblich bearbeiteten Frage der „**Zweienzymtheorie**" begann mit dem Befunde von OHLSSON (*l. c. 200*), daß man das „dextrinbildende" Enzym von der „Dextrinase" trennen kann, indem saure Reaktion (ph = 4) das erstere zerstört, ph = 11 aber die Dextrinase; letztere wird auch bei ph = 6 und Erhitzen auf 70° allein zerstört. Eine ganz entsprechende Beobachtung machte NISHIMURA **85)**; er führte sie aber nicht auf 2 Amylasen, sondern auf einen Aktivator zurück, der bei ph = 3 inaktivirt, bei ph = 7,4 wieder wirksam wird. OHLSSON **86—93)** setzte

85) ***S. Nishimura,*** Aktivator der Malzamylase. Bioch. Zs., **200,** 81 (1928). S.A. — 86) ***E. Ohlsson,*** On the two compon. of malt-diastase. C. R. Carlsberg Labor., **16,** H. 7 (1926). S.A. — 87) ***Ders.,*** Die beiden Komp. der Malzdiastase. Zs. phys. Chem., **189,** 17 (1930). S.A. — 88) ***O. Edfeldt, G. Nordh, T. Swaetichin,*** Exist. von zwei Kompon. in der Malzdiastase. Bioch. Zs., **223,** 478 (1930). S.A. — 89) ***G. Nordh, E. Ohlsson,*** Amyl. in ruh. und keim. Samen. I. Gerste. Zs. phys. Chem., **204,** 89 (1932). S.A. — 90) ***E. Ohlsson, C. E. Uddenberg,*** Amyl. in ruh. und keim. Samen II. Roggen. ebd., **221,** 165 (1933). S.A. — 91) ***E. Ohlsson, O. Edfeldt,*** Amyl. in ruh. und keim. Samen III. Hafer. ebd., **221,** 174 (1933). S.A. — 92) ***T. Stenstam, C. O. Björling, E. Ohlsson,*** Amyl.in ruh. und keim. Samen. IV. Weizen. Zs. phys. Chem., **226,** 265 (1934). S.A. — 93) ***E. Ohlsson, T. Swaetichin,*** Ét. sur la takadiast. Bull. Soc. Chim. Biol., **11,** 333 (1929). S.A.

dann seine Arbeiten fort und konnte die beiden Enzyme auch weiterhin chemisch differenziren (s. u.). Er sah aber selbst, daß seine beiden neuen Enzymarten nicht genau den im Laufe der Entwicklung immer wieder postulirten Typen der „Amylase" und „Dextrinase" entsprechen und gab ihnen deshalb neue Namen: **Dextrinogen-amylase** und **Saccharogen-amylase**. Dies war insofern ein erheblicher Schritt zur prinzipiellen Klärung, als in diesen Namen die Tatsache ihren Ausdruck fand, daß beide Fermente eben „Amylasen" sind, d. h. Stärke selbst angreifen, wenn auch in verschiedener Weise, nicht aber das eine nur Stärke, das andere nur Dextrine. OHLSSON stellte dann auch selbst fest, daß die auf ganz anderem Wege (§ 366a) entdeckten 2 Amylase-abarten R. KUHN's **94)**

Vergleich der Thermo-resistenz beider Amylasen nach OHLSSEN.

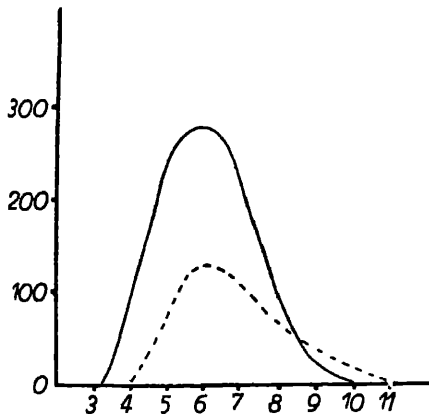



Abb. 39. Die Halbierungszeiten bei ung. 6°.
——— Saccharogenamylase.

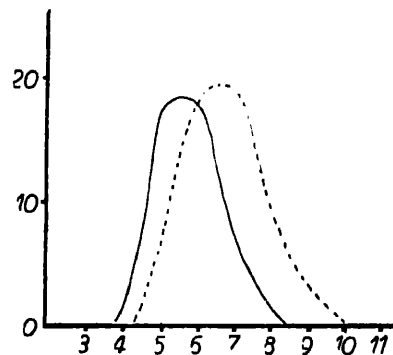



Abb. 40. Die Halbierungszeiten bei 38°.
------- Dextrinogenamylase.

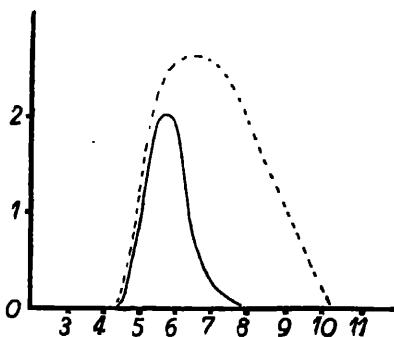



Abb. 41. Die Halbierungszeiten bei 50°.
——— Saccharogenamylase.

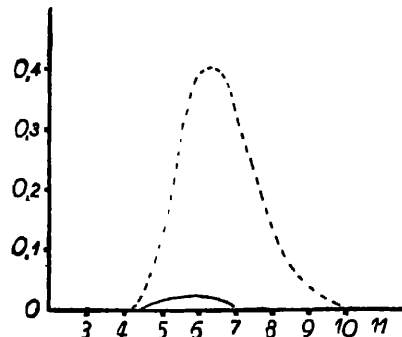



Abb. 42. Die Halbierungszeiten bei 60
------- Dextrinogenamylase.

völlig den seinen entsprechen. Die β-Maltose erzeugende Malzamylase entspricht seiner Saccharogen-, die α-Maltose erzeugende tierische und Takadiastase seiner Dextrinogen-amylase, wenigstens der Hauptsache nach; denn alle Präparate enthalten beide, nur in stark wechselndem Verhältnis.

94) ***R. Kuhn,*** Wirk. Mech. der Amylasen. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **448,** 1 (1925). S.A.

Chemische Differenzirung der Ohlsson'schen Amylasen. OHLSSON **86, 87)** mißt die Dextrinogen-amylase (D. A.) mit der Jodmethode nach WOHLGEMUTH, die Saccharogen-Amylase (S. A.) durch Maltose-bildung. Schon durch Dialyse wird die D. A. praktisch zerstört, S. A. nur zu 50 %. S. A. ist bei niedriger Temp. und niedrigem ph beständiger als D. A., letztere bei höherer Temp. Daraus ergaben sich als praktische Verfahren zur Trennung:

S. A. (β): Ansäuern von Malzlösung bei 0° bis ph = 3,3; nach 15′ wieder auf ph = ca. 6 puffern. D. A. völlig zerstört, S. A. zu fast 80 % erhalten.

D. A. (α): Malzlösung bei ph = 6—7 15′ auf 70° erwärmen; S. A. praktisch zerstört, D. A. zu 75 % erhalten *).

Bestätigung durch EDFELDT **88)** gegenüber einer Anzweiflung von ERNSTRÖM. Auf ähnlichem Wege gelangte bei Weizen zu den beiden Enzymen CREIGHTON **94a)**; Erhitzen resp. Ansäuern, fractionirte Fällung mit Alkohol ergab feste Präparate je nachdem von α- resp. β-Am. Praktisches Verfahren zur Herstellung einheitlicher β-Amylase VAN KLINKENBERG (l. c. 116, S. 80). Ungekeimter Weizen mit 50%igem Alkohol extrahirt, mit 80%igem gefällt.

Die ph-Aktiv-Kurve ist verschieden: S.A. breites Optimum von 4—5,75; D.A. Opt. = 5,5—6. (Abb. § 385). β-Amylase von Roggen hat eine etwas andere Kurve **(90)**, Hafer wie Gerste **(91)**, Weizen: α 4,6—6,3, β 4,9—5,3 **(94a)**. Bei *Sorghum* hat α nach ACHARYA **95)** zwei Optima bei 4,8 und 6,0. Weitere Angaben § 385.

S.A. bildet β-Maltose, D.A. α-Maltose; es entspricht also die S.A. der β-, die D.A. der α-Amylase KUHN's. S.A. wird stärker von β-Maltose, D. A. von α-Maltose gehemmt (VAN KLINKENBERG, l. c. 114).

Eine Trennung unter Erhaltung beider Abarten durch auswählende Adsorption gelang WALDSCHMIDT-LEITZ **96, 97)**. α-Amylase wird aus Grünmalz-extrakt bei ph = 3,8 von Tonerde Cγ nicht adsorbirt, β vollständig; letztere kann durch alkalische Elution gewonnen werden; bei 5,5 werden beide adsorbirt. Dasselbe gelingt auch bei Gerste, hier ist die α-Amylase vorhanden (s. u.), aber inaktiv, kann durch Amylokinase aktivirt werden; es wird aber auch β durch Amylokinase aktivirt.

Nach HOLMBERGH **98)** kann man durch alle Arten von Stärke (auch Dextrine und Cellulose) in 40 % alkohol-Lösung des Enzympräparates (Malz) bei Gegenwart von Maltose und 0° oder — 10° die α-Amylase quantitativ heraus-adsorbiren, am besten ph = 5,4. Weitere Angaben über zweckmäßige Vor-Reinigung des Malzextraktes (Calciumacetat, fraktionirte Alkoholfällung) **99) 100)**. Auch durch Ausfällung von Tricalcium-phosphat ist (nach HOLMBERGH **101)**) eine selektive Adsorption der α-Am. möglich; genauere Angaben **102)**.

Nach GIRI **102—104)** kann man sogar durch einfache Alkoholfällung des Malzextraktes

---

*) Im Interesse der historischen Wahrheit sei erwähnt, daß OHLSSON **86)** die Legende zerstört, daß GRÜTZNER (1876, *l. c. 197*) zuerst die Trennung der beiden Amyl. durch Erhitzen nachgewiesen habe; in Wirklichkeit gebührt BOURQUELOT (*l. c. 198*) das Verdienst.

94a) ***M. Creighton, N. M. Naylor,*** Starch-digesting and sugarform. enz. of wheat. Iowa State Coll. Jl. Sci., **7,** 253 (1933) BPh **75,** 79. — 95) ***C. N. Acharya,*** Hydrol. of starch by Sorghum. Ind. Jl. Agr. Sci., **4,** 476 (1934). — 96) ***E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel, A. Purr,*** α- und β-Amylase. Naturwiss., **1932,** 254. — 97) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Amylokinase. Zs. phys. Chem., **213,** 63 (1932). S.A. — 98) ***O. Holmbergh,*** Trenn. der zwei Malzamyl. durch Sorption. Ark. Kemi, **11** B Nr. 4 (1932). — 99) ***Ders.,*** Adsorpt. von α-Amylase aus Malz an Stärke. Bioch. Zs., **258,** 134 (1933). — 100) ***Ders.,*** Adsorption von α-Amylase. Bioch. Zs., **266,** 203 (1933). — 101) ***Ders.,*** Adsorpt. von α-Amylase an Ca-Phosphat. Ark. Kemi, **11** A Nr. 20 (1935). S.A. — 102) ***K. V. Giri,*** Separ. of the two comp. of amylase. Current Sci., **2,** 128 (1933); BPh **77,** 166. — 103) ***Ders.,*** Amylases from Batata. Jl. Indian Chem. Soc., **11,** 339 (1934). — 104) ***Ders.,*** Chem. Natur der Amylasen. Bioch. Zs., **275,** 106 (1934).

beide Am. teilweise trennen. Wenn man 50 % Alkohol zusetzt und scharf zentrifugirt, enthält der Niederschlag die gesamte β-Am., nur 47 % der α.

Von noch nicht abzusehender Bedeutung ist der Befund von WALDSCHMIDT-LEITZ 97), daß Amylokinase (§ 392) nur auf pflanzliche Amylasen, und zwar beide, aktivirend wirkt, auf tierische garnicht. Ob hier ein essentieller Unterschied beider Enzymtypen im eigentlichen Bau vorliegt, oder nur im weiteren System, ist noch nicht bekannt. Man könnte daran denken, daß die Amylokinase bei der pflanzlichen Am. als eine Art Pheron-Ersatz zur Synthese neuen aktiven Enzyms im Sinne KRAUT's führen könnte, jedoch ist das eben nur eine Vermutung.

Verteilung der beiden Abarten. Entgegen der ersten Annahme kommen in allen Präparaten beide Amylasen vor. OHLSSON 89) hatte wie erwähnt im Malz beide Amylasen gefunden, mehr β als α. Dagegen sollten ungekeimte Gerste und die anderen Samen nur β enthalten, α erst bei der Keimung auftreten, so daß beide Enzyme unabhängig von einander entstehen. Die α-Am. sollte bei der Keimung erst gegen Ende der ersten Woche nachweisbar sein, dasselbe für Roggen **(90)** und Hafer **(91)** gelten. Auch MYRBÄCK **105)** fand in Gerste nur β; sie ist in Samen z. T. ein Desmo-enzym, wird durch die eigenen Proteinasen der Samen oder durch zugesetztes Papain (§§ 376, 394) freigelegt, aber auch dabei entsteht nur β. Es gelang aber WALDSCHMIDT-LEITZ **96)** der Nachweis, daß in ungekeimter Gerste beide Enzyme vorhanden sind; nur ist die α-Am. hier inaktiv, wird erst durch die bei der Keimung entstehende Amylokinase aktivirt (§ 392). Immerhin geht auch daraus hervor, daß man einen Auszug aus Gerste als reine β-Am. betrachten kann.

Da BAKER c. s. **105a)** auch mit Auszug aus ungekeimtem Hafer auf lösliche Stärke nur Maltose fanden, ist wohl auch hier nur β vorhanden; auf Stärkekleister wirkt sie langsamer als Roggen; gekeimter Hafer bildet auch Dextrine. Kartoffel verhält sich wie Malz (BORCHARDT c. s., l. c. 14), enthält aber etwas weniger β. Mandel-emulsin sowie Biolase, ein technisches Enzympräparat aus Lupinensamen **(106)** sollen nach PRINGSHEIM **107)** α-Am. enthalten, letztere Glucose bilden (s. u.). Die Eigenart der Biolase ist noch ziemlich unklar, eine Reinigung durch Adsorption ist GLIMM **108)** nicht gelungen.

Auch in *Sorghum vulgare*, dem *Cholam* der Inder, sind zwei Am. gefunden worden, die man als „verflüssigende" und „verzuckernde" bezeichnet hat. Cholam soll mehr der ersten, weniger der zweiten enthalten als Malz **(109)**; man kann beide durch Elektro-osmose trennen **(110)**. ACHARYA **95)** hat die verflüssigende mit der α-Am., die andere mit der β-Am. gleichgesetzt. Cholam enthält viel reichlicher α, weniger β als Gerstenmalz. Am. von *Ragi* (*Eleusine coracana*) hat nach PATWARDHAN **111)** eine größere Verzuckerungskraft als *Sorghum* und Mais, aber eine geringere als Malz. Am. aus *Ipomoea batatas* enthält nach GIRI **102—104)** praktisch nur β, ähnelt durchaus den Am. der Getreidesamen, nicht der der Kartoffel.

Taka enthält vorwiegend α-Am. (KUHN **94)**, OHLSSON **93)**), aber auch reichlich β (GIESBERGER **112)**).

---

105) ***K. Myrbäck, S. Myrbäck,*** Gersten- und Malzamylase. Bioch. Zs. **258**, 158 (1933). — 105a) ***J. L. Baker, H. F. E. Hulton,*** Amyl. of cereal grains. Oats. Jl. of Chem. Soc., **1929**, 1655. — 106) ***H. Wrede,*** Verflüss. von Stärke mittels Biolase. Der Papierfabr. (Cellulosechemie, Techn. Teil), **27**, 197 (1929). — 107) ***H. Pringsheim, E. Schapiro,*** Ferm. Abbau der Stärke durch Biolase. Ber. Chem. Ges., **59**, 996 (1926). — 108) ***E. Glimm, L. v. Gizycki,*** Biolase. Bioch. Zs., **248**, 449 (1932). — 109) ***V. N. Patwardhan, (R. V. Norris)***, Stud. in enzyme action, Cholam-Amylase. Jl. Ind. Inst. Sci., A **11**, 121, **13**, 31 (1929/30). — 110) ***D. Narayanamurti, R. V. Norris,*** Nature of Amylase. Jl. Ind. Inst. Sci., A **11**, 134, **13**, 69 (1930). — 111) ***V. N. Patwardhan,*** Amyl. from Ragi, ebd., **13**, 38 (1930). — 112) ***G. Giesberger,*** Pankreas-, Speichel- und Asperg.-Amyl. etc. Kon. Akad. Wet. Amsterdam, **37**, 336 (1934). S.A.

Tierische Amylasen: Pankreas enthält vorwiegend α (KUHN, SAMEC u. WALDSCHMIDT-LEITZ **113**)). Ebenso ist die Am. der Leukocyten und die aller Organe betont α (WILLSTÄTTER, l. c. 34, 36); aber auch diese enthalten β, wenn auch wenig (WIJSMAN'sche Diffusions-methode, GIESBERGER **112**)).

Wirkung der beiden Amylasen. Wie oben erwähnt, glaubte OHLSSON in seinen beiden Enzymen tatsächlich endlich die lange gesuchten beiden Stufen-Fermente gefunden zu haben, wenn auch in etwas anderer Form, da sie beide Stärke angreifen; er hat sie auch danach benannt. Er nahm zwar an, daß beide auf die Stärke selbst wirken, aber doch in ganz verschiedener Weise. Die S.A. sollte gleich Maltose abspalten, und „Dextrine" hinterlassen, die dann allmählich weiter zerlegt werden. Die D.A. sollte aber zunächst das Molat nur in mehrere etwa gleich große Teile zerlegen, in höhere Dextrine, die dann wieder in niedere Dextrine zerfallen, bis schließlich Maltose entsteht (**86**, **87**). Diese Annahme, auf der OHLSSON eine Theorie des Stärkeabbaus aufgestellt hat, ist in dieser Form nicht zu halten. Zuerst wies VAN KLINKENBERG **114—116**) darauf hin, daß die Namen irreführend sind, denn auch die Dextrinogen-amylase bildet schnell und reichlich Zucker und kann durch Reduktion gemessen werden. VAN KLINKENBERG sah ganz richtig, daß beide Amylasen einen qualitativ verschiedenen Angriffspunkt haben. Dies ist inzwischen von SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ **113**) eingehend behandelt worden. Im übrigen kann OHLSSONS Theorie schon deshalb nicht exakt stimmen, weil beide Amylasen schon die relativ einfachen definirten Abbaustoffe spalten, nämlich die Amylo-hexaose (**117**) und das kristallisirte Erythrodextrin (**118**); darauf kommen wir unten zurück.

Ebenso wenig sind aber die Folgerungen, die VAN KLINKENBERG aus seiner an sich richtigen Einstellung zieht, stichhaltig, und seine daraus geschöpfte Theorie des Stärkeabbaues (§ 372) wird allgemein abgelehnt, zum mindesten in ihren Einzelheiten. Die Verhältnisse sind überaus komplicirt und noch durchaus nicht geklärt: der Kernpunkt ist der, ob die chemisch trennbaren beiden Stärkeanteile: Amylose und Amylopectin, resp. ihre organischen Strukturtypen, Amylokörper resp. Erythrokörper besondere Beziehungen zur α- resp. β-Amylase haben; oder ob es davon ganz unabhängig zwei sterisch verschiedene Arten von Stärke gibt, die auf α- resp. β-Amylase specifisch reagiren. Die erstere Ansicht wird besonders vertreten von WALDSCHMIDT-LEITZ und SAMEC **113**, **113a**); die letztere von VAN KLINKENBERG.

Den Ausgangspunkt bilden die feststehenden Tatsachen, daß beide Amylasen reichlich Maltose bilden, also keine in diesem Sinne etwa nur ein „dextrinirendes" Enzym ist. Aber bei der Wirkung der β bleibt die blaue Jodfärbung lange erhalten, fast bis zu Ende der Gesamtspaltung, während sie bei α schnell verschwindet, und zwar über rot. Die β bildet einen Restkörper (§ 372), der nicht (oder schwach) reducirt und von α-Amylase weiter angegriffen wird. Alles mehr ins Einzelne gehende ist unsicher; und noch mehr ist es die Deutung. VAN KLINKENBERG glaubt sichergestellt zu haben, daß die β-Am. genau 64 % der Stärke in Maltose umwandelt; der Rest, der

---

113) ***M. Samec, E. Waldschmidt-Leitz,*** Enzymat. Spaltbark. der Amylo- und Erythrokörper aus Stärke. Zs. phys. Chem., **203**, 16 (1931). S.A. — 113a) ***M. Samec,*** Wirk. der β-Amyl. auf einige Stärkesubst. Zs. phys. Chem., **236**, 103 (1935). S.A. — 114) ***G. A. van Klinkenberg,*** Trenn. und Wirk. der beiden Malzamyl. Proc. Roy. Acad. Amsterdam, **34**, 893 (1931). — 115) ***Ders.,*** Spezif. der Amylasen. Zs. phys. Chem., **209**, 253, **212**, 173 (1932). S.A. — 116) ***Ders.,*** Spec.-Problem der Amylasen. Erg. Enzymf. III, 73 (1934). S.A. — 117) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Krist. Hexaose aus Stärke. Zs. phys. Chem., **228**, 76 (1934). S.A. — 118) ***L. Köhler-Hollander,*** Krystall. Erythrodextrin. ebd., **228**, 249 (1934).

so viel umstrittene „Restkörper", ist noch „Stärke", der alten Erythrogranulose WIJSMAN's gleichzusetzen; er reducirt nicht, was SAMEC **113a)** bestreitet (s. u.). Seine Menge ist also = 36 % der Stärke, er wird nur von α gespalten. Umgekehrt zerlegt α-Amyl. nur eben diese 36 % schnell, den Rest viel langsamer. Dies wird von GIESBERGER **112)** bestätigt.

Daraus schließt VAN KLINKENBERG nun, daß von vornherein zwei ganz verschiedene Anteile in der Stärke vorhanden sind, eine α-Stärke und eine β-Stärke, die je nachdem α- resp. β-Maltose liefern und „mutamer" sein sollen; entsprechend dem α,β-Gleichgewicht bei der Maltose selbst (64 % β, 36 % α) (§ 372). Für beide ist je eine Amylase absolut specifisch, und der totale Abbau schließlich durch beide Am. dadurch zu erklären, daß mit dem Verbrauch der einen allmählich eine Umlagerung in die andere Form statthat. Da die α-Stärke nach seiner Meinung tatsächlich α-Bindungen, die β-Stärke β-Bindungen enthält, so ist die Specifität der beiden Amylasen eine sterische und damit eine absolute Specifität. Glykogen ist reine α-Stärke (wie der Restkörper), es soll demgemäß von β-Amylase überhaupt nicht angegriffen werden. Daß diese Theorie viel zu schematisch ist, und daß weder ihre Voraussetzungen — z. B. der nur bis 36 % gehende Abbau durch α-Amylase — stimmen, noch die theoretische Grundvorstellung von wahrhaften β-Bindungen, die zur β-Maltose in direkten Beziehungen stehen, brauchen wir hier nicht zu wiederholen.

VAN KLINKENBERG leugnet also die Beziehungen zu den Amylo- resp. Erythrokörpern und deutet das Erhaltenbleiben der blauen Jodreaktion dadurch, daß eben seine β-Stärke garnicht mit Jod färbt. Sie kann also abgebaut werden, ohne daß sich an der blauen Jodreaktion etwas ändert. Die rote Jodreaktion interessirt ihn überhaupt nicht sehr, sie soll nur auf einer verschieden festen Bindung des Jods beruhen.

Das halten allerdings SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ **113, 113a)** auch für möglich, aber in ganz anderem Sinne: die rote Jodfarbe ist in jedem Falle zwar nur ein Zeichen relativ geringerer Jodbindung überhaupt; aber das hat seine Ursachen in Strukturverhältnissen. Die Blaufärbung bedeutet nur viel größere Aufnahme von Jod; sie ist also zu beziehen auf stärkere Nebenvalenzaffinitäten durch bestimmte Lagerungen von Sauerstoffen; diese können auch im Sinne VAN KLINKENBERG's sterisch verschieden sein. Entweder gibt es von vornherein eine blaufärbende und eine rotfärbende Gruppe, oder bei der Rotfärbung ist die blaufärbende Gruppe geschwächt oder abgeschirmt. Dies ist hier enzymtypisch zunächst mal ohne Belang; die Hauptsache ist, daß die Specifität beider Amylasen sich nicht auf zwei ganz verschiedene mutamere „Stärken", sondern auf die beiden auch sonst durchaus charakterisirbaren Gruppirungen in den gewöhnlichen Stärken richtet. Wie wir bereits §§ 366a, 372 berichtet haben, ist die α-Am. specifisch eingestellt auf die blaufärbende Amylogruppirung, die sie sehr schnell zerstört, schon bei ca. 20 % Verzuckerung, während β-Amylase die blaufärbende Gruppe — wie allgemein angenommen — sehr lange völlig intakt läßt.

Die Erythrogruppirung wird dagegen durch β unter der typischen Abwandlung der Jodreaktion (für die Gesamtstärke) blau-violett-rot-braunrot-farblos abgebaut. Reine Erythro-amylose wird überhaupt nur von beiden Amylasen zusammen total abgebaut, während sowohl mit β wie mit α ein schwer spaltbarer Rest bei 40—50 % Spaltung verbleibt. In beiden Fällen geht hier die Jodreaktion der Verzuckerung symbat: bei beiden Amylasen beginnt bei ca. 60 % Verzuckerung die Färbung von Rot in Braunrot überzugehen, um erst bei hohen Verzuckerungsgraden ganz zu verschwinden. Dabei entstehen stets schwer spaltbare Zwischenprodukte, die eine Verlangsamung der Reaktion zwischen 40—50 % Verzuckerung herbeiführen.

Es muß aber das Mißverständnis vermieden werden, als ob diese Specifität nach der Gruppe des Angriffs unbedingt auch mit dem Grade des Abbaus zusammenhängen müßte. Zwar greift die α-Amyl. zunächst die spezielle Amylo-gruppirung an und zerstört deren specifische „Blaugruppe", d. h. sie ändert eine Struktur oder eine Konfiguration mit besonders starken Nebenvalenzen; dabei tritt der so charakteristische Übergang von blau nach rot, das Erythro-stadium, auf. β-Am. hat diese Wirkung nicht, sie setzt an anderen Gruppen an und läßt die „Blaugruppen" intakt, d. h. im nicht abgebauten Rest-anteil; im abgebauten Anteil verschwindet natürlich auch die Blaugruppe, wie sich aus der quantitativen Messung der Jodaufnahme (bei gleichem Farbton) schätzen läßt; es wird also nicht (s. u.) im Sinne VAN KLINKENBERG's eine von vornherein nicht färbende β-Stärke abgebaut. Dabei verschwindet die Blaufärbung direkt, ein Erythrostadium tritt nicht auf. Aber der Grad des Abbaus ist ein anderer, eher umgekehrt: α-Am. greift grade die Erythrokörper tiefergehend an als die Amylo-körper; während β die Amylosubstanzen glatt zu Ende spaltet, treten bei α-Amyl. Hemmungen bei ca. 80 % Verzuckerung auf. Auch aus Mischungen greift β-Amyl. zuerst die Amylokörper heraus und baut sie ab. Es ist also für den Abbau nicht etwa die α-Amyl. specifisch für Amylokörper, sondern eher umgekehrt, specifisch ist sie hier nur für den ersten Angriff, die Aufhebung der „Blaugruppirung". Da im Allgemeinen Amylosubstanzen leichter gespalten werden, so kann man sich mit SAMEC vorstellen, daß dieselben starken Nebenvalenzen, die so viel Jod aufnehmen, auch das Enzym stärker binden, und umgekehrt bei der Erythrogruppirung dem Enzym der Zutritt erschwert ist.

Abb. 43. Maltose-Bildung in % durch β-Amylase nach SAMEC **113a**).

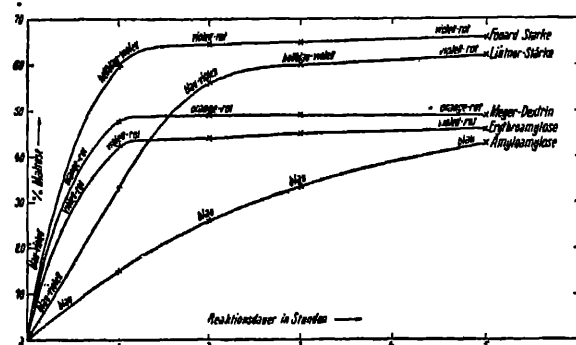



Abb. 44. Maltose-Bildung und Jodfärbung verschiedener Stärke-Arten durch β-Amylase nach SAMEC **113a**).

SAMEC **113a**) hat diese Verhältnisse nochmals genauer untersucht an der Hand einer einheitlichen β-Amylase. Wenn man Amylo-amylose untersucht, so zeigt sich bei Wirkung von β-Am. Erhaltenbleiben der Blaufärbung bis 90 % Maltose, dann erst tritt Übergang in violett-rosa ein. Dagegen erfolgt mit α-Am. Farbumschlag bereits bei 25 % Maltose, bei 45 % über Rotbraun Farblosigkeit. Erythrokörper werden durch Malz (α + β) total zerlegt; reine β spaltet bis 56 % Maltose, α (Pankreas) bis 70 %. In beiden Fällen Verlangsamung bei 40—50 %. Bis 60 % bleibt die rote Jodfarbe erhalten, geht dann in Braunrot über und verschwindet im letzten Stadium. Amylo-amylose wird durch β zwar langsam, aber total gespalten (105 % Maltose).

Abgeschlossen: 2. 12. 35. Ber. Phys. 88, H. 7/8.

Stärkegemische (LINTNER- und FOUARD-Stärke) werden schneller durch reine β gespalten, aber nur zu 60—70 %, wobei immer erst der Amylo-anteil zerlegt wird. Reine Erythrokörper (Erythroamylose, Amylodextrin - A. MEYER) werden nur zu 40—50 % zerlegt. Im Gegensatz zu VAN KLINKENBERG ist beim β-Abbau das quantitativ gemessene Nachlassen der Jodfarbe anfangs ebenso schnell, von 40 % Maltose an sogar schneller als die Maltosebildung; es wird also keine ungefärbte „β-Stärke" abgebaut. Der Dispersitätsgrad hat nur Einfluß auf die Geschwindigkeit des Abbaus, nicht den Endeffekt. Der aus Vollstärke, d. h. deren Erythro-Anteil bei Wirkung von β-Am. nach VAN KLINKENBERG entstehende Restkörper ist keine „Stärke" (α-Stärke) sondern ein Erythrodextrin, das reducirt und 13—15 Glucosen (Molgew. ~ 2000) enthält (wahrscheinlich also ein Gemisch eines 12-Dextrins mit einem 18-Dextrin, § 372); entsprechende reducirende Restkörper fand HAWORTH **118a)**, die 10—18 Glucosen enthalten; sie sind sämtlich Erythro-dextrine. Die Wirkung anderer Diastasen ist noch wenig untersucht. Taka wirkt nach SAMEC **119)** auf die Jodfärbung wie Gerste, also β, was zunächst auffallend ist, da man zuerst Taka für so gut wie reine α hielt; aber nach GIESBERGER **112)** enthält auch sie beide Am. Die sonderbare Biolase, die trotz ihrer pflanzlichen Herkunft α sein soll, verzuckert nur bis zu 56 % (GLIMM **108)**).

Eine vollkommen klare Deutung aller dieser Beobachtungen ist noch nicht möglich. Wenn auch grade die Aufklärung solcher Probleme sehr wichtig werden kann für die Lösung des Stärke-Rätsels, so wird andererseits umgekehrt bisher noch die Ausdeutung dieser Befunde durch die Unklarheit über die Grundfragen verhindert. Immerhin sind erhebliche Fortschritte prinzipieller Art darin enthalten. Es ist nunmehr sichergestellt, daß bei den verschiedenen Amylasen das Auftreten reducirender Zucker und das Verschwinden der blauen Jodreaktion nicht parallel gehen, was die alten Beobachtungen über solche Differenzirungen endlich quantitativ stützt und jedenfalls auf die Verschiedenheit auch der Wirkung der beiden Typen von Amylase schließen läßt, so daß das Auftreten von α- resp. β-Maltose nicht nur in das Endstadium verlegt werden kann, und die WALDEN'sche Umkehrung aus reiner α-Maltose-Bindung in β (§ 366a) noch unwahrscheinlicher wird.

Soweit das Prinzipielle. Wie man aber die speziellen Ansichten (nicht die Versuche) von OHLSSON mit denen von SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ vereinigen soll, sehe ich vorläufig noch nicht. Grade seine „Saccharogen"-Am., die β, läßt ja die jodbläuende Amylogruppirung noch lange bestehen, während die „Dextrinogen-Am.", die α, sie schnell zerstört, wobei allerdings ein ausgesprochenes „Erythrodextrin-Stadium" schon im ersten Drittel der Verzuckerung auftritt, während dies bei der β nur ganz flüchtig bei etwa 90 % Verzuckerung erscheint, und erst bei 100 % der achromische Punkt erreicht wird. Wenn man also, wie dies allerdings hergebracht ist, die Abstufung blau-violett-rot-farblos auf eine Stufenfolge der verschiedenen Dextrine im Abbau bezieht, dann stimmen OHLSSON's Bezeichnungen und seine Ansichten; aber das eben kann man heute nicht mehr, wie wir mehrfach erörtert haben (§§ 371, 372). „Blau" heißt nicht ohne weiteres „hohes Molgewicht", dann violett-rot-farblos absteigendes Molgewicht, also über „Dextrinirung" zu „Zucker"; die Färbung hängt vielmehr an sich wenig oder garnicht mit der Molgröße zusammen, sondern ist das Ergebnis einer mehr oder minder starken Aufnahme von Jod, die mit dem Vorhandensein besonderer jodbindender Gruppen zusammenhängt; und diese sind auf Strukturverschiedenheiten zu beziehen. Wenn also β-Amylase reichlich Zucker bildet bei erhaltener blauer Jodreaktion, so heißt das nicht im Sinne OHLSSON's, daß hier direkt aus Stärke oder noch ganz hohen Umwandlungsprodukten sogleich ein Anteil an Zucker gebildet wird, ohne das — schematisch ausgedrückt — „Dextrinstadium" zu durchlaufen, während der Rest noch aus ganz hohen Dextrinen (blaufärbend) besteht; tatsächlich sind neben dem Zucker auch andere relativ niedermolekulare Dextrine vorhanden, die aber noch blau färben. Und umgekehrt bildet auch α-Am. „Dextrine", aber sie

118a) ***W. N. Haworth,*** Constit. of starch. Chem. and Ind., **1934,** 1059. — 119) ***M. Samec,*** Stärkedextrine. Bioch. Zs., **187,** 120 (1927).

zerstört die blaufärbende Amylogruppirung, so daß die rotfärbenden Abbaustufen allein hervortreten; und dies gibt nach der älteren Auffassung zu der Vorstellung Anlaß, daß hier ein Zerfall in „höhere", d. h. noch rotfärbende Dextrine vorherrschen soll. Tatsächlich aber werden wohl unter der Wirkung der α-Amylase gleich kleinere, wenn auch noch rotfärbende Bruchstücke auftreten, die der β-Am. viele Angriffspunkte bieten.

Es handelt sich also nicht um verschiedene Wirkungen an demselben Substrat, resp. demselben Angriffspunkt, sondern um den Angriff der beiden Enzyme an qualitativ verschiedenen Gruppen. Wie diese sich unterscheiden — wahrscheinlich durch die Lage der Sauerstoffbrücken oder durch eine Abwandlung der jodbindenden Gruppen —, können wir noch nicht sicher sagen, das hängt eben immer wieder mit den Rätseln des Stärkeaufbaus zusammen (§ 366a, 372). SAMEC **113a)** entnimmt aus seinen Studien über die Eigenschaften und den Abbau der Amylo- und Erythrokörper als Arbeitshypothese, daß die α-Amylase angreift an der Sauerstoffbrücke in den Zuckern selbst, sei es am OH oder am Brücken-Sauerstoff, die β aber an dem in glykosidischer Ätherbindung stehenden Sauerstoff. Er schließt dies daraus, daß eben α-Am. viel schneller die jodbindende Funktion (Sauerstoffbrücke) aufhebt als Glykosidbindungen öffnet (Reduktion). Besetzung des OH an der Brücke bringt ähnliche Verschiebungen der Jodreaktion zuwege wie die α-Amylase.

Zu dieser Frage sei ein bisher ganz isolirt dastehender, aber bei weiterer Verfolgung vielleicht wichtiger Befund von ZIESE **120)** hier herangezogen. ZIESE hatte schon früher festgestellt, daß der Glykol-aether der Cellulose durch Cellulasen derart angegriffen wird, daß das Molekül in größere Bruchstücke zerfällt, ohne daß Cellobiose (erkennbar an Reduktion) auftrat. Als er nun den analogen Versuch mit dem Glykol-aether der Stärke (Oxyaethylstärke) anstellte, fand er β-Amylase völlig unwirksam, während α-Am. (Pankreas, Speichel, Taka) besonders bei Aktivirung durch Amylokinase den Aether derart angriff, daß die Viscosität stark absank, ohne daß Reduktion auftrat; auch die Drehwerte blieben unverändert. Danach wird die auch von VAN KLINKENBERG diskutirte Frage wieder aufgerollt, ob nicht doch in der α-Amylase ein nur **„desaggregirendes" Enzym** vorhanden ist, das dann wieder irgendwelche Beziehungen zu dem rein „verflüssigenden Enzym" von CHRZASZCZ (*l. c. 153, 154*) (s. o.) haben würde, wie auch LÜERS (l. c. 44) einen Zusammenhang der α-Amylase mit dem niemals sichergestellten „verflüssigenden" Enzym vermutet hat, da z. B. die Kurven des durch Papain freigelegten Enzyms in keimender Gerste für Verflüssigung und Jodfärbung die gleichen sind. Andererseits aber ergeben Ausschaltungsversuche der α-Am. doch wieder Differenzen zwischen der Dextrinirung und der Verflüssigung, so daß LÜERS doch schließlich auf die auch hier vertretene Annahme zurückgreift, daß die „Verflüssigung" überhaupt kein selbstständiger Prozeß ist, also auch keines eigenen Enzyms bedarf, vielmehr eine notwendige Folge der Aufspaltung der großen Molate ist. Hierzu sei noch der eigenartige Befund von LÜERS (l. c. 69a) vermerkt, daß ein technisches Diastasepräparat aus Bakterien (*Superclastase*) sehr weitgehend „verflüssigt" (Abnahme der Viscosität um 90 %), ohne daß überhaupt Maltose auftritt.

ZIESE selbst nimmt an, daß kein so weitgehender Abbau eintritt, wie ihn die starke Abnahme der Viscosität anzeigen würde (auf $^1/_{10}$, also von 50 auf 5 Glucosen), daß vielmehr eher hier das STAUDINGER'sche Gesetz nicht mehr zutrifft; denn die Produkte sind noch schwer dialysable Kolloide.

Man kann also nicht, wie OHLSSON es vorgeschlagen hat, auf seinen Befunden eine Theorie des Stärkeabbaus dahingehend entwickeln, daß die α-Amylase das Stärkemolat in hohe wenig reducirende Dextrine zerlegt, während die β-Am. gleich vom Anbeginn an aus der Stärke — oder etwa „Amylodextrinen" mit auch noch blauer Jodfarbe — Zucker abspaltet. Man muß vielmehr annehmen, daß die α-Amylase

120) ***W. Ziese,*** Einwirk. von Amyl. auf Oxyäthylstärke. Zs. phys. Chem., **229**, 213 (1934); **235**, 235 (1935). S.A.

in der Amylo-amylose einen ganz besonderen strukturell bedingten Angriffspunkt vorfindet, welcher der β nicht zugänglich ist; diese hat dann eben sehr wahrscheinlich einen anderen primären Angriffspunkt. Das zeigt sich erstens darin, daß ja beide abbauen und Zucker bilden, daß aber auch bei reiner α-Wirkung während des Abbaus in großem Umfange ein Gebilde entsteht, das der α-Wirkung unzugänglich ist und nur von β-Amylase weiter zerlegt wird, während β-Am. zwar Amylo-amylose total zerlegt, von Vollstärke aber einen Erythro-Anteil als „Restkörper" hinterläßt. Ferner darin, daß bei reiner Erythro-amylose, bei der die specifische blaufärbende primäre Angriffsgruppe der α-Am. fehlt, durch beide Amylasen ein gleichmäßiger und gleichmäßig verlangsamter Abbau stattfindet. Daß diese gesamte Frage nicht mit dem Stärkemolat und den mehr oder minder hochmolekularen Dextrinen zusammenhängt, folgt schließlich zwingend daraus, daß sowohl das kristallisirte Erythrodextrin KÖHLER-HOLLANDER's **118)** wie auch die ganz niedermolekulare Amylohexaose von WALDSCHMIDT-LEITZ **117)** (§ 369) ebenfalls noch von beiden Amylasen in der charakteristischen Weise angegriffen werden, daß α-Am. eben α-Maltose bildet, β-Am. β-Maltose, und daß durch beide wie üblich am Ende α,β-Maltose resultirt. Auch in diesem einfachsten „Dextrin" ist also noch Gelegenheit für den ganz verschiedenartigen Angriff beider Enzyme gegeben. Dieses Ergebnis ist ebenso wichtig für die Beurteilung der specifischen Affinität der beiden Enzyme wie für den Stärkeaufbau selbst; denn es zeigt, daß die „Amylostruktur" (die bei der Wirkung der β-Amylase bis zum Ende erhalten bleibt) irgendwie mit dem Auftreten der β-Maltose im Zusammenhang steht, in dem Sinne, daß sich aus dieser Struktur ganz zum Schluß β-Maltose bildet. Vielleicht haben eben die supponirten alloiomorphen Zucker, die man nach § 366a mit dem Auftreten der β-Maltose in Verbindung bringen kann, wegen ihrer labilen Sauerstoffbrücken eine stärkere Nebenvalenz-Kraft und damit erhöhte Affinität zum Jod, die sich dann auswirkt, wenn noch ein großes Molekül vorhanden ist; denn daß andererseits diese vermutete „Amylostruktur" allein zur Jodbindung nicht ausreicht, zeigt die Tatsache, daß Amylo-hexaose mit Jod nicht mehr färbt.

Nur ein anderer Ausdruck für die Strukturspezifität der beiden Amylasen ist es, wenn PRINGSHEIM **121)** die Ansicht vertritt, daß die β-Amylase dasjenige Enzym ist, das seine Amylobiose (§ 368) aufspaltet, so daß er also Amylobiase = β-Amylase setzt; denn dieses Disaccharid soll ja eine Struktur aus zwei ungleichen Glucosen besitzen. α-Am. greift die Amylobiose nicht an, wohl aber das Dihexosan. In Anbetracht der Unklarheit über Existenz und Struktur der Amylobiose hilft auch diese Annahme nicht weiter.

Wichtiger für die Strukturauffassung der Stärke ist, ob durch eine kombinirte Wirkung beider Enzyme an etwa zwei verschiedenen glykosidischen Brücken (sogenannten α-, resp. β-Bindungen, vgl. § 366a) anstatt oder neben Maltose **Glucose** entstehen kann. Wir haben § 368 vermerkt, daß PRINGSHEIM die Glucosebildung zwar erzielen, aber nicht sicher reproduciren konnte, und daß RONA **122)**, sowie SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ **113)** sie mit Gemischen beider Amylasen nicht auffinden konnten. Ebenda ist bemerkt, daß nach GOTTSCHALK **123)** das Enzympräparat aus dem (maltasefreien) *Sacchar. Ludwigii* direkt Glucose bildet, und ebenso das technische Enzympräparat Biolase (PRINGSHEIM, l. c. 107), das nach WREDE (l. c. 106) aus Lupinensamen hergestellt wird; dies soll aber nur in der Kälte so wirken, bei 70° dagegen ein Trisaccharid bilden. Das letztere konnte GLIMM (l. c. 108) nicht auffinden,

---

121) ***H. Pringsheim, J. Leibowitz,*** α- und β-Amylasen. Ber. Chem. Ges., **58**, 1262, **59**, 991 (1925/6). — 122) ***P. Rona, J. Hefter,*** Gleichzeit. Wirk. von Speichel-, Pankreas-, Malzamylase auf Stärke. Bioch. Zs., **217**, 113 (1930). — 123) ***A. Gottschalk,*** Aufbau und Vergär. von Glykogen d. maltasefreie Hefen. Zs. phys. Chem., **152**, 132 (1926).

wohl aber Glucose. Es ist sehr bedauerlich, daß auch mit Hilfe der wirkungsrein getrennten Amylasen diese wichtige Frage noch nicht geklärt werden konnte.

Zur Vermeidung von Mißverständnissen muß noch erwähnt werden, daß auch SYNIEWSKI 125) seit jeher zwei verschiedene Amylasen α und β annimmt, die mit seiner Theorie des Stärkeaufbaues verknüpft sind, und durchaus nicht mit den KUHN'schen Definitionen übereinstimmen; eher umgekehrt; denn seine α-Amylase wird durch Erwärmen vernichtet, also nach der Methode, wie OHLSSON seine Dextrinogen-am. $= \alpha$-Am. hergestellt hat. Tatsächlich gibt er an, daß alle Getreide-arten „α" enthalten, am wenigsten Hafer (IV). α wirkt nur Zucker bildend, nur auf gelöste Stärke; β wirkt nur Stärke „lösend", erinnert also an das „verflüssigende" Enzym, das aber, wenn es überhaupt diskutirbar, eher im Sinne KUHN's α ist. Umgekehrt gibt sein Schüler POLAK 126) an, daß β-Amyl. die Jodfarbe zum Verschwinden bringt, was mit SAMEC und WALDSCHMIDT-LEITZ bezgl. der β-Amyl. übereinstimmt. Erhitzter Malzextrakt, in dem also hier die α vernichtet sein soll, greift unter Aufhebung der Jodreaktion Amylose nur bis 36% an, wie bei VAN KLINKENBERG die α-Am. Durch Papain wird seine β-Amyl. aus Gerste freigelegt, — wieder wie die jetzige β (MYRBÄCK, l. c. 105). Aber das soll nur durch Umwandlung von α in β vor sich gehen. Neuerdings gibt SYNIEWSKI 127) nochmals an, daß man aus Gerste durch kalten Auszug α, bei 68° β erhalten kann, und daß Kartoffelstärke am besten durch ein Gemisch $70\alpha + 30\beta$ verzuckert wird.

Amylase des Muskels. Ein Wort muß noch einem sehr seltsamen Problem gewidmet werden, über das wir nicht viel mehr sagen können, weil es noch völlig undurchsichtig ist, nämlich die Art und Wirksamkeit der Amylase des Muskels. Es liegt beim Muskel insofern eine Besonderheit vor, als er nach erfolgtem Glykogen-abbau niemals Zucker nach außen abgibt, sondern nur Milchsäure ganz im Gegensatz zur Leber. Wir kommen darauf § 406 zurück und geben dort auch die Lit. An sich enthält der Muskel zweifellos eine ganz normale Amylase, wenn man sie in der üblichen Weise mit Stärke als Substrat mißt, und so hat sie z. B. WILLSTÄTTER (l. c. 36) auf ihren Zustand in der Muskelzelle hin untersuchen können. Aber bei der Zerlegung von Glykogen, also ihrem natürlichen Substrat, soll die Muskelamylase ausschließlich ein Trisaccharid bilden (BARBOUR, § 368); und was noch viel sonderbarer ist, dieses Trisaccharid soll gegen die glykolytischen Kräfte resistent sein und nicht phosphorylirt werden. Die Bildung dieses Zuckers soll aber aus Muskelglykogen auch durch andere zugesetzte Amylasen im Muskelextrakt erfolgen (Pankreas u. a.) und infolgedessen wirkt Pankreas eben durch den Gehalt an Amylase hemmend auf die Glykolyse und (bei Tumoren) auch auf die Atmung. Infolgedessen nimmt CASE (vgl. § 406) an, daß diese von BARBOUR in vitro beobachtete Bildung des resistenten Trisaccharids nicht der normale Abbauvorgang im Muskel sein kann, daß die derart extrahirte Amylase sozusagen „entartet" ist, daß sie also im Muskel ganz anders wirkt, und daß mithin die Muskelamylase keine „normale" Amylase sein kann. Er denkt vielmehr an ein ganz intimes automatisches Ineinanderarbeiten dieser speziellen Muskelam. mit dem zymatischen System in dem Sinne, daß beide Enzyme als sozusagen „Mischkatalysatoren" auf demselben Träger wirksam sind, und daß dann bei der rein hydrolytischen Wirkung eben Produkte entstehen, die der Zymase sofort zugänglich sind. An sich ist diese Komplikation nicht nötig. Es genügt anzunehmen, wie wir des öfteren betont haben (§ 366a), daß aus Glykogen durch ganz normale Hydrolyse durch eine gewöhnliche Amylase primär eben labile Zuckerarten entstehen, die wohl in der Stärke vorgebildet sind, und die beim Vorhandensein des zymatischen Systems sofort umgesetzt werden. Fehlt dies aber wie in den Muskelextrakten, so stabilisiren sich diese labilen Formen; in der Norm zu Maltose, aber u. U. auch zu anderen stabilen Gebilden, und diese sind dann eben dem geschwächten System der Muskelzymase in Extrakten ebenso unzugänglich wie es ja Glucose auch ist. Unerklärt freilich ist die ausgesprochene Hemmung durch zugesetzte Amylasen. Eine Aufklärung dieser Zusammenhänge wäre sehr wichtig für das Problem des Stärkeaufbaus ebenso wie das der Wirkung der Amylasen. Es sei noch hinzugefügt, daß sich nach SOMOGYI die Am. des Blutes ganz ähnlich verhalten soll: keine Maltose, sondern ein Trisaccharid, resp. eine Art Isomaltose (§ 368, l. c. 106, 119a).

---

125) ***W. Syniewski,*** Diastase I—IV. Bioch. Zs., **158**, 87, **162**, 228, 236 (1925), **192**, 457 (1928). — 126) ***F. Polak, A. Tychowski,*** Umwandl. von α-Diast. in β-Diast. ebd., **192**, 463 (1928), **214**, 216 (1929). — 127) ***W. Syniewski, S. Zieminski,*** Optim. Mengenverhältnis der α- und β-Diast. ebd., **253**, 266 (1932).

Das zellwandlösende Enzym der Hefe. Eine Beobachtung von großer Tragweite, die aber noch nicht genügend ausgenutzt ist, scheint mir die bereits § 310 mitgeteilte Tatsache zu sein, daß nach GRASSMANN und PETERS **128)** reine Malzamylase (β) die Zellwände der Hefe *) soweit auflöst, daß die Saccharase hindurchpassiren kann, was eben bei der Autolyse der Hefe ebenso durch zelleigene Enzyme geschieht. Dagegen wirkt auf diese wandbildenden Kohlenhydrate, — wenigstens nicht in dem genuinen Symplex mit Proteinen —, die α-Amylase (Pankreas) absolut nicht ein. Es würde dieser Befund also zu den § 372a geschilderten Bindungsformen grade der Erythrokörper an Proteine zu höheren Komplexen passen, wenn wir nun eben annehmen könnten, daß die β-Amylase hier noch einen Angriffspunkt findet, während die der α zugängliche Blaugruppe völlig abgeschirmt ist. Bei den Zellwänden der Hefe dürfte es sich dabei z. T. wenigstens um Glykogen-Symplexe handeln. Aber es ist noch nicht klargestellt, ob es sich überhaupt um einen betonten Angriff einer wahren Amylase, d. h. auf Stärke bzw. Glykogen handelt; es wird zwar die Wirkung von Cellulase ausdrücklich ausgeschlossen; aber es spielt dabei noch das Mannose enthaltende Hefegummi (H.W. S. 559) eine unaufgeklärte Rolle. Denn bei der enzymatischen Freilegung der Saccharase geht dies KH reichlich in Lösung, wobei nach KRAUT c. s. **129)** ein besonderes sehr stabiles Enzym eine Rolle spielt, über das Näheres noch nicht bekannt ist, vielleicht eine Mannanase; vielleicht ist also die Malzextrakt-wirkung auf Hefe diesem Enzym ganz oder teilweise zuzuschreiben. Eine weitere Aufklärung dieser Verhältnisse wäre sehr wichtig, weil man in diesen KH der Hefe vielleicht ein specifisches Substrat der β-Amylasen in die Hände bekommen könnte.

5) Amylokoagulase, Amylosynthease.

§ 380. In der Frage, ob es eine Umkehrung der Stärkespaltung, eine enzymatische Reversion des Prozesses gibt, sind zwei ganz verschiedene Probleme zusammengeworfen worden. Einerseits hat man die Retrogradation der Stärke als einen solchen Umkehrprozeß betrachtet, andererseits eine wahrhafte Reversion etwa vom Dextrinstadium zurück zur Stärke gesucht.

Wir konnten schon im H.W. S. 681 darauf hinweisen, daß eine Amylokoagulase nicht existirt, daß vielmehr bei der Retrogradation ein rein physiko-chemischer Vorgang abläuft. Dieser ist ja nun inzwischen, besonders durch KATZ, eingehend studirt und aufgeklärt worden. Es handelt sich um nichts anderes als einen speciellen Kristallisationsvorgang mit bestimmter Einlagerung von Wasser, der zu einem bei allen Stärken identischen Kristalltypus mit einheitlichem Röntgen-diagramm führt (§ 372). So sei nur noch aus historischem Interesse der m. W. letzte Versuch, das Enzym Amylokoagulase (Gerste und Roggen) zu retten, angegeben (JOSZT **130)**).

Dagegen ist es wohl berechtigt, die Frage zu stellen, ob man eine enzymatische

*) Die zellwandbildenden KH der Hefe sind noch wenig bekannt. Neuerdings fand ZECHMEISTER **127a)** ein Glucan darin, das anscheinend mit Cellulose nichts zu tun hat, da es aus 1,3-Ketten besteht. Nach SEVAG **127b)** sind alle bisher mehr weniger frei isolirten Polyosen Kunstprodukte der Aufarbeitung.

127a) ***L. Zechmeister, G. Tóth,*** Polyose der Hefemembran. Bioch. Zs., **270,** 309 (1934). 127b) ***M. G. Sevag, C. Cattaneo, L. Maiweg,*** Hefepolysaccharide. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **519,** 111 (1935). 128) ***W. Graßmann, T. Peters,*** Freileg. des Inv. aus der Hefe. Zs. phys. Chem., **204,** 135 (1932). S.A. — 129) ***H. Kraut, F. Eichhorn, H. Rubenbauer,*** Darstellung des Hefengummis durch Abbau etc. Ber. Chem. Ges., **60,** 1644 (1927). — 130) ***A. Joszt c. s.,*** Amylokoagulase. Rocn. Nauk Rolniczych (poln; Res. dtsch. oder französ.), **10,** 617, **11,** 468, **13** (1923/8). S.A.

Reversion der Stärke aus Abbaustufen experimentell auffinden kann; und wenn, ob auch hier wie sonst die Amylasen selbst die Reversion vornehmen, oder ob hier einmal eine besondere Synthease wirksam ist. Es ist nämlich grade hier eher möglich, als bei allen anderen enzymatischen Abbauprozessen, daß es sich nicht um einfache Gleichgewichte handelt, sondern um Prozesse ganz anderer Art, für deren Umkehr ein Specialferment nötig wäre.

Der Abbau der Stärke ist ja, wie wir immer wieder betont haben, wahrscheinlich keine einfache Hydrolyse, sondern geht bei der Zerlegung des eigentlichen Moleküls, nicht des Aggregates, mit allerlei strukturellen Umwandlungen einher.

Wir haben mehrfach darauf hingewiesen, daß man — nicht enzymatisch, sondern durch chemischen Abbau — Stoffe erhalten kann, die von selbst wieder zu durchaus stärkeähnlichen Gebilden zusammentreten (§ 371), während dies eben die normalen enzymatischen Abbaustufen, die Dextrine, nicht tun. Es wäre also durchaus möglich, daß im biologischen Stärkeaufbau ein besonderes Enzym eine Rolle spielt, das bestimmte zuerst aus Glucose resp. Maltose entstehende Aufbaustufen durch strukturelle Umwandlung in eine solche Form bringt, daß sie nun von selbst in echte Stärke übergehen. Dann wäre also die „Synthease" zwar specifisch, aber ihre synthetische Wirkung eine indirekte, und solch eine Synthease könnte man sich noch am ehesten gefallen lassen. Über solche möglichen Aufbauprozesse wissen wir noch nichts; wir können bisher nur Vermutungen hegen, daß etwa gewisse Hexosane oder auch die Polyamylosen dabei eine Rolle spielen, wenn sie durch enzymatische Umlagerung mit Hilfe eines Specialfermentes entstehen. Es ist dies um so interessanter, als grade auch die Umwandlung von „Erythro"-in „Amylokörper" (nachgewiesen durch den Übergang der Jodfärbung von rotviolett nach blau) behauptet wird, die ja verschiedene Struktur haben sollen. Auch VAN KLINKENBERG (**116**, S. 91) deutet diese „Synthese" als Strukturwandlung; in seiner Ausdrucksweise als von (nicht farbgebenden) β-Bindungen in α.

Die Existenz eines solchen aus niederen Dextrinen hochmolekulare Stoffe vielleicht bis zur Stärke selbst bildenden Special-enzyms wird unbeschadet seiner noch unbekannten Wirkungsweise von NISHIMURA **131—136)** behauptet. Er fand es in der Hefe: Erythro-stärke aus Klebreis (*Oryza glutinosa*) wird durch das Enzym binnen 3 Tagen in jodbläuende Stärke übergeführt; Achroodextrine werden unter dem Einfluß des Autolysates aus Trockenhefe zu Stoffen mit blauvioletter Jodfärbung, die Retrogradation zeigen und durch Amylasen spaltbar sind. Sie zeigen ein hohen Dextrinen zukommendes Verhalten in bezug auf Löslichkeit, Viscosität, Reduktion, Molgröße (**131, 132**), etwa wie Amylodextrin (**135**). Die Erscheinung hat mit der sog. Amylokoagulase des Malzextraktes, d. h. der Retrogradation nichts zu tun (**133**).

Dextrine der Wirkung von β-Amylase (auch das „Grenzdextrin") werden leichter revertirt als solche durch α-Am. (Pankreas, Taka **133/4**)). Die Reversion von Achroodextrin bis zu einem blau färbenden Dextrin gelingt zu 84 % (**135**); das Enzym wirkt auch auf Hexosane (**136**); Darstellung von „löslicher Stärke" (**136**).

Isolirung des Enzyms und Befreiung von Amylase (**136**): Ammonsulfatfällung des Autolysats wird mit Glycerol behandelt, dabei Amylase entfernt. Reinigung über Adsorption. Bleiacetat fällt aus Hefenautolysat die Amylosynthease, Amylase bleibt in Lösung. Elution

---

131) ***S. Nishimura***, Stärke verflüss. Enzym in Trockenhefe. Bioch. Zs., **223**, 161 (1930). S.A. — 132) ***Ders.***, Enzym. Synth. der höh. Dextrine. ebd., **225**, 264 (1930). S.A. — 133) ***Ders.***, Amylosynthease. ebd., **232**, 156 (1931). S.A. — 134) ***Ders.***, Wirk. der Amylosynth. auf Dextrine versch. Herkunft. ebd., **237**, 133 (1931). S.A. — 135) ***S. Nishimura, T. Minagawa***, Amylosynthease. Proc. Imp. Ac. Tokyo, **7**, 258 (1931). S.A. — 136) ***T. Minagawa***, Amylosynthease II, III, IV. ebd., **8**, 244, **9**, 97 (1932/3), **11**, 17 (1935). S.A.

durch $NaHCO_3$. Auch durch Fällung mit $CdCl_2$ von Amylase zu trennen ((**136**), II). Opt. ph = = 6,2, opt. Temp. 20—25°. Schwermetalle hemmen das Enzym schon in Spuren; auch KCN, Ferrisulfat, Formaldehyd stark (**133**).

Das Enzym findet sich in anderen Hefen, fehlt aber bei wilden Hefen, Taka, *Botrytis*, *Monilia* und in Bakterien (**135**); vorhanden in Kartoffel und Reis (**136**). Das des Reises wird durch Alkohol und Aceton gefällt, kann aus der Fällung mit $HgCl_2$ durch H_2S wieder freigesetzt werden, Löslich in Glycerol; opt. ph = 6,2, opt. Temp. 35—46°. Dasselbe Enzym in Mais, Hirse etc.

6) Zymogen.

§ 381. Wir haben bereits im H.W. S. 682 versucht klarzustellen, daß von dem ursprünglichen Begriff eines Zymogens der Amylase nicht viel Greifbares übrig geblieben ist. Es wurden früher allerlei Dinge durcheinander gebracht. Was wir heute wissen, ist allerdings das, daß es zweifellos Am. in unwirksamen Zustande gibt, nämlich insoweit sie unter Inaktivirung an die Zellsymplexe gebunden sind, wie in ruhenden Samen. Besonders bei pflanzlichen Amylasen gibt es aber außerdem sozusagen ein wirkliches „Zymogen", nämlich die absolut inaktive α-Am. der ungekeimten Gerste etc., die nach WALDSCHMIDT-LEITZ nur durch ein besonderes Agens, die Amylokinase aktivirt wird. Darauf werden wir § 392 eingehen, ebenso auf die Frage, ob es außerdem, wie PRINGSHEIM annimmt, noch ein zweites, nur auf die Verzuckerung des Restkörpers wirksames Agens, ein „Komplement" der Am. gibt.

Eine neue Note bringt FUCHS **137**) in die alte Zymogenfrage hinein. Nach seiner Angabe kann man aus „inaktiver Amylase" einen „Ambozeptor" isoliren, der dann durch das Prothrombin des Blutes, das mit dem „Mittelstück" des Komplementes identisch ist, zu wirksamer Am. aktivirt werden kann. Diese Angabe kann hier naturgemäß nur registrirt werden; auf die von FUCHS vertretene Ansicht über die Beziehungen zwischen Fibrinferment und Komplement kommen wir beim Kap. Thrombase zurück.

Was man sonst noch als „Zymogen" wieder neu belebt hat, sind immer wieder Dinge, die nicht genau zu präzisiren sind. So glaubt BODNÁR **138**) ein thermostabiles Zymogen von Samen-amylasen annehmen zu dürfen, weil in den Mehlen selbst bei Gegenwart von Wasser sogar bei 100° die verzuckernde Wirkung nicht erlischt. Bei der Keimung verschwindet diese Thermostabilität. Für diese Umbildung des „Zymogens in aktives Enzym" ist Sauerstoff nicht notwendig. Auch Blätter enthalten das Zymogen, auch im Dunkeln stärkefrei gemachte. Wahrscheinlich handelt es sich um nichts anderes als schützende Bindung an Zellkolloide. Die Frage dieses „Zymogens" steht andererseits in untrennbarem Zusammenhang mit der „Reaktivirung" thermisch inaktivirter Amylase, auf die wir § 382 zurückkommen.

---

137) ***H. J. Fuchs***, Amylase und Prothrombin. Zs. exp. Med., **79**, 35 (1931). — 138) ***J. Bodnár, J. Villányi***, Thermostab. des pflanzl. Amylase-zymogens. Bioch. Zs. **169**, 1 (1926).

C. Einfluss äusserer Faktoren *).

I. Physikalische.

1) Temperatur.

§ 382. Über die Temperaturabhängigkeit der Amylasen als resultirende Kurve der Aktivitätsbeschleunigung und der Enzymzerstörung haben wir schon im H.W. S. 685 ff. eine große Menge kontroversen Materials zusammengetragen. Viel klarer ist die Sachlage heute auch nicht geworden. Wirklich exakte Messungen an isolirten und gereinigten Einzelenzymen, mit genauer Kenntnis der Wirkungen der Elektrolyte, der Zucker, der kolloidalen Stoffe liegen auch heute noch kaum vor. Es bleibt nicht viel anderes übrig, als die neuen mehr oder weniger vergeblichen Versuche, Klarheit zu schaffen, zu referiren.

Immerhin gelangt man allmählich zu einer vertieften Auffassung des Wesens der Vorgänge, die der Thermo-inaktivirung hauptsächlich zu grunde liegen. Es handelt sich wohl sicher um Verminderung der Dispersität, um eine Denaturirung mit beginnender Hydrolyse der Proteinanteile des Enzyms (s. Moelwin-Hughes **139)**), die bei völliger Inaktivirung bis zu einer Ablösung des Agons von seinen die Wirksamkeit tragenden specifischen Oberflächen gehen kann, oder bis zu einer Okklusion des Agons in unwirksame Kolloidmassen. Es werden die Beziehungen deutlicher zu den Inaktivirungen durch Adsorption, zur Förderung und Hemmung durch den ph, durch Elektrolyte und organische koagulationshemmende Stoffe, wie Zucker, Glycerol, Aminosäuren etc.

So deuten Sherman (*l. c. 196*) **140)** und Cook **141)** die Wärmeinaktivirung als eine Koagulation der Protein-anteile des Enzyms resp. des weiteren Systems, der dann eine Hydrolyse folgt. Infolgedessen wirken Aminosäuren schützend (Sherman); Tryptophan aber, das erst bei tieferer Hydrolyse der Proteine frei wird, schützt nur bei höherer Temp. (40° bei längerer Dauer, 50° in 30′). Oparin **142)** schließt sich dieser Ansicht an und verweist darauf, daß dieselben Stoffe gegen die Wärme-inaktivirung schützen, welche die Koagulation hemmen oder die Amylase aus den inaktiven Adsorbaten eluiren. So schützt Saccharose ganz erheblich (noch keine volle Zerstörung bei 3′ 90°), Glycerol schwächer. Die bei Gegenwart von Saccharose inaktivirte Am. kann durch Pepton ebenso regenerirt werden, wie Pepton die unwirksame Am. des Eiweiß-adsorbats wirksam eluirt (§ 384), resp. als „Eleuto-amylase" wirkt (§ 392).

Diesen Ideen über den Zusammenhang von Dispersität und Wärmeinaktivirung ent-

*) Um überflüssige Wiederholungen zu vermeiden, sind einige hierhergehörige Angaben über Temperaturwirkungen und opt. ph. bei weniger wichtigen Amylasen erst bei deren specieller Behandlung gegeben, vgl. also auch die §§ 394 ff.

139) ***E. A. Moelwin-Hughes,*** Kinetics of enz. reactions. Ergebn. Enzymf. II, 1 (11), Leipzig 1933. — 140) ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, N. M. Naylor,*** Infl. of tryptophane etc. upon . . . pancr. amyl. Jl. Amer. Chem. Soc., **47**, 1702 (1925). S.A. — 141) ***D. H. Cook,*** Temp. coeff. . . . of pancr., and malt amyl. Jl. of biol. Chem., **65**, 135 (1925). — 142) ***A. Oparin, S. Manskaja,*** Hitzeinaktiv. der Amylase. Bioch. Zs., **260**, 170 (1932).

spricht auch, daß nach FILIPOWICZ **143)** Am. beim opt. ph ebenso wie gegen die Wärme-koagulation auch gegen Alkohol am wenigsten empfindlich ist. Es seien im Anschluß daran noch einige Einzelangaben erwähnt. Malzam. ist nach COOK **141)** beständiger als die des Pankreas. Zerstörung bei Malz 60° in 30′, bei Pankreas 50° in 15′. — Trockenpräparate (Sojaam.) vertragen nach ORESTANO **144)** bis über 100°, bei 150° gehen sie zu grunde.

Tötungstemp. der Speichelam. im Sinne v. EULER's (halbe Zerstörung in 1 h) = 57,5° (EGE **145)**) (ph = 6,8, optimale Cl^--Konz.; bei ph = 3,2 aber 19°, ph = 4,0 39°). Q_{10} der Inaktivirung schwankt stark, am größten bei niedriger Temp., gering bei saurer Reaktion. Bei Körpertemp. und saurer R. schnell zerstört (vgl. § 385) ARRHENIUS-Konstante A am größten beim opt. ph. der Stabilität (6,8). Harnamylase verhält sich nach NÖRBY **146)** ähnlich; wenig empfindlich bei < 40° (ph 5—9), ARRHENIUS-Konst. A = 120.000. — Am. der Zuckerrübenblätter nach DOBY **146a)** im frischen Brei 42°, Trockenpräparat 56°. Ähnlich Kartoffelblätter **(146b)**.

Der Gang der Inaktivirung von Taka-amylase folgt nach YAMASHIKI **147)** bei den untersuchten Tempp. (55°—65°) der Kurve der monomolekularen Reaktion; ebenso bei der Am. von *Ipomoea* (GIRI, l. c. 102—104).

Eine **Regenerirung** von bei 90° (bis zu 3 Min.) inaktivirter Taka-am. gelingt nach OHLSSON **148)** durch einfaches Stehenlassen bei Zimmertemp.; die Aktivität steigt langsam wieder an; Ausmaß abhängig vom ph. Bei saurer R. bis 6,85 ist die Inaktivirung endgiltig, bei > 7,0 etwas Reaktivirung; bei 7,0 bis zu 47 %. 10 Min. bei 90° bewirken irreversible Zerstörung. — Bei Speichelamylase keine Reaktivirung (BROEZE **149)**), ebensowenig bei Am. der Zuckerrübenblätter (DOBY **146a)**).

Was nun die resultirende **Wirksamkeit bei verschiedenen Tempp.** anlangt, so gibt YAMASHIKI **147)** eine deutliche Aktivirung der Takaam. bei 45° an. Q_{10} für Speichelamylase zwischen 20 und 30° = 2 (BROEZE **149)**); Leberamylase Opt. 40°, beim Hund bis 50° konstant, Kaninchen bei 50° schon vermindert (VISCO **149a)**), Q_{10} für Am. der Blätter (Zuckerrübe) von 30—40° 1,45, A = 7000, für Dauerpräparate 1,22, A = 3900 (niedriger als andere Pflanzenamylasen) (DOBY **146a)**). Kartoffelblätter: Opt. 38,8° **(146b)**.

Den Einfluß von Cl^- auf die Temperaturabhängigkeit der Speichelamylase haben TRAUTMANN u. AMBARD **150)** untersucht. Q_{10} (Intervall 15°) stieg von 1,04 bei praktisch salzfreier Amylase auf 2,11 bei 0,1 %, blieb dann konstant. Ganz ähnlich wirken Br^- und J^-. Versuch, die Vorgänge physiko-chemisch zu deuten: Der Prozeß ist zweistufig: A ist die Aufnahme des „Coferments" an das Enzym, nämlich von $H^+ + Cl^-$, B die Adsorption des kompletten Enzyms an die Stärke und die Hydrolyse. Geht A bei hoher NaCl-Konz. sehr schnell vor sich, kann man B allein berechnen. So läßt sich Q_{10} für verschiedene NaCl-Konzz. berechnen.

---

143) ***Br. Filipowicz,*** Infl. of proteins etc. on enz. hydrol. of starch. Bioch. Jl., **25,** 1874 (1931). — 144) ***G. Orestano, C. Zummo,*** Fluidif. . . . del amido da parte dell amil. etc. Boll. Soc. Ital. Biol., **5,** 246 (1930). — 145) ***R. Ege,*** Einfl. der Temp. auf . . . Ptyalin. Zs. phys. Chem., **224,** 129 (1934). S.A. — 146) ***G. Nörby,*** Estim. and stabil. of urine-amyl. C. R. Labor. Carlsberg, **18,** H. 7 (1931). — 146a) ***G. v. Doby, L. v. Brázay,*** Amyl. der Zuckerrübenblätter. Ferm.-Forsch., **13,** 212 (1932). — 146b) ***G. v. Doby, E. Szladits,*** Saccharogenamyl. der Blätter verschieden ernährter Kartoffeln. Zs. phys. Chem., **206,** 177 (1932). — 147) ***H. Yamashiki,*** Course of the inactiv. in the starch dig. enz. I—V. Acta Schol. Med. Kyoto, **16,** 350—372 (1934); BPh **30,** 512. — 148) ***E. Ohlsson, O. Edfeldt,*** Takadiastase II. Bull. Soc. Chim. Biol., **15,** 470 (1933). S.A. — 149) ***J. R. Broeze,*** Einw. des Ptyalins auf Stärke. Bioch. Zs., **204,** 286 (1929). S.A. — 149a) ***S. Visco, W. Duce,*** Amil. del fegato I. Boll. Soc. ital. Biol., **4,** 267 (1929); BPh **52,** 160. — 150) ***S. Trautmann, L. Ambard,*** Act. de la temp. sur . . . l'amylase. Bull. Soc. Chim. Biol., **16,** 35 (1934); Soc. Biol., **114,** 10; BPh **77,** 167, 514.

Nach BAUER 151) lassen sich diese Verhältnisse dadurch deuten, daß die Zeit τ der Grundreaktion von zwei Faktoren abhängig ist: bei sehr geringer Konz. an Cl^- tritt eine umgekehrte Proportionalität zu $[Cl^-]$ hervor; bei höherer Konz. ein anderer davon unabhängiger Faktor. Er stellt die Formel auf:

$$\tau = \frac{1}{\nu} = \frac{\lambda}{[Cl^-]} + \mu; \; \nu = \frac{[Cl^-]}{\lambda + \mu\,[Cl^-]}$$

(ν die Reakt. Geschw., λ und μ die beiden Konstanten, die von der Konz. der Ionen an sich unabhängig sind). Er verfolgt dann diese Fragen mathematisch weiter unter Berücksichtigung auch der $[H^+]$ und kommt zu einer Ablehnung der Theorie von AMBARD und zu einer Deutung des Einflusses der Ionen auf die Amylasewirkung an sich; wir können hier nicht näher auf seine Theorie eingehen, die experimentell noch nicht nachgeprüft ist.

Gegenwart von NaCl bei ph 6,5 verschiebt das Wirkungsoptimum der Pankreasam. von 30° der salzfreien Am. auf 50° (ROTINI 152)).

Eine biologische Anpassung gibt CHESLEY 153) an. Die Temperaturoptima liegen Mensch>Schildkröte>Fisch (Clupeide *Brevoortia tyrannus Latrobe*); bei 3,5° ist die Wirksamkeit Fisch>Mensch>Schildkröte (Mensch Speichel, sonst Pankreas).

Als Wirkungsoptimum für die Praxis werden wieder, wie gelegentlich schon früher, hohe Temp. angegeben; es ist schwer zu verstehen, wieso solche Angaben gegenüber der sichergestellten Tatsache immer wieder auftauchen, daß die Am. an sich sehr empfindlich gegen auch nur mäßig erhöhte Tempp. sind. So sei nur registrirt, daß LECOQ 154) angibt (für Am. von roher und gekeimter Gerste): auf rohe Mehle 75°, bei Gerstenmehl auch auf gekochtes Mehl; bei anderen Mehlen sinkt das Opt. auf 60°, wieder andere Zahlen für angeteigte Mehle. Anscheinend ist hier die Temp.-Wirkung auf die Zugänglichkeit der Substrate wichtiger als die Erhaltung der Enzyme an sich.

2) Strahlenwirkung u. Ae.

§ 383. Gewöhnliches und polarisirtes Licht. BALY 155) hatte angegeben, daß polarisirtes Licht auf Am. eine stärker fördernde Wirkung habe, als gewöhnliches Tageslicht. Nach verschiedenen Anzweifelungen hat dann BUNKER 156) wohl endgiltig nachgewiesen, daß diese Aktivirung durch polarisirtes Licht nicht existirt.

Auch NAVEZ c. s. 157) fanden keinen Unterschied gegenüber Tageslicht. Dieses wirkt an sich aktivirend, was sich aber nur erkennen läßt, wenn man das Amylase-präparat im Dunklen reinigt. Durch das Licht wird also anscheinend ein Hemmungskörper zerstört. Fluorescirende Farbstoffe (Fluorescein, Eosin) verstärken die Lichtwirkung, indem sie am Licht ein Peroxyd bilden, das den Hemmungskörper zerstört. Dazu ist zu bemerken, daß nach CLAUS 158) diese Farbstoffe auch im Dunklen die Am. aktiviren (§ 391), was aber PINCUSSEN (l. c. 164) nicht gefunden hat.

Quarzlampenlicht (U-V-Strahlen). PINCUSSEN hatte in früheren Arbeiten (H.W. S. 689, *l. c. 205, 205a*) festgestellt, daß die stärkste Schädigung beim opt. ph statthat, sowie daß die Inaktivirung mit fortschreitender Reinigung stärker wird, endlich daß Elektrolyte schützen.

---

151) ***E. Bauer,*** Méc. des act. diastas. etc. Jl. de Chim. Phys., **31**, 535 (1934). S.A. — 152) ***O. T. Rotini,*** Attiv. dell amil. pancr.... del cloruro sodico. Ann. Labor. Spallanzani, **2**, 55 (1931). — 153) ***L. C. Chesley,*** Infl. of temp. upon the amylases of cold- and warm-blooded anim. Biol. Bull., **66**, 330 (1934); BPh 81, 658. — 154) ***R. Lecoq,*** Opt. de tempér.... des f. amylolyt. Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 26 (1925). — 155) ***E. C. C. Baly, E. S. Semmens,*** Photoch. act. of polar. light.—Hydrol. of starch. Proc. Roy. Soc. B. **97**, 250 (1924); Nature, **1925**, 817. — 156) ***J. W. M. Bunker, E. G. E. Anderson,*** Polar. light and starch hydrol. Jl. of Biol. Chem., **77**, 473 (1928). — 157) ***A. E. Navez, B.B. Rubenstein, (W. J. Crozier)***, Starch hydrol. as affected by polar. light. Jl. of biol. Chem., **80**, 503 (1928), **95**, 645 (1932). — 158) ***G. Claus,*** Dunkelwirk. fluorescier. Farbstoffe auf Diast. Bioch. Zs., **204**, 456 (1929).

Pincussen c. s. **159—165**) haben seither diese Arbeiten fortgesetzt an einer Handelsdiastase ohne weitere Reinigung. Bei ausreichender Substratkonz. folgt die Inaktivirung der Kurve einer monomolekularen Reaktion. Bei Überschuß an freiem Enzym stärkere Inaktivirung, bis dieser Überschuß beseitigt ist. Stärkste Abnahme bei ph = 6,26. Phosphate und Chloride in geringer Konz. schützen, Nitrate und Nitrite kaum (**160**). Die durch U-V-Licht geschädigte Malzam. kann durch Zusatz unbestrahlter Am. z. T. reaktivirt werden, um so mehr, je stärker die Inaktivirung vorher war; wahrscheinlich handelt es sich demnach um reversible Dispersitätsveränderungen (**162**). Bei der Inaktivirung durch U-V-Licht wirken Ionen verändernd ein, Kalium verstärkt, Ca vermindert die Schädigung. Die Reihe der Verstärkung geht Mg > Na, K > Rb, Li > Ca (**163**). (Bei der Wärme-Inaktivirung: Mg, Ca > Alkali-Ionen). Fügt man den Amylase-Lösungen Jodide zu, so wird bei saurer Reaktion im Lichte freies Jod abgespalten (**161**). Dadurch wird Malzamylase stark geschädigt, dagegen Speichel und Taka geschützt, namentlich bei schwach alkal. Reakt. (ph = 7,65), Pankreas nicht beeinflußt. Die günstige Wirkung des Salzes an sich scheint die schädliche Jodwirkung aufzuheben.

Zusatz von Sensibilatoren (Eosin u. dergl.) bewirkt mit zunehmender Konz. Abnahme der Lichtschädigung (im Dunklen wirken die Farbstoffe garnicht). Wahrscheinlich verbrauchen die Farbstoffe die wirksamen Strahlen selbst. Die stärkere Wirkung der Strahlen auf reinere Präparate wurde bestätigt (**164**). Die Temperatur, bei der bestrahlt wird (**165**) hat einen eigentümlichen Einfluß. Mit steigendem ph nimmt bei 50° die Lichtschädigung beinahe auf Null ab. Die oben erwähnte Regenerirung durch frisches Enzym findet bei gleichzeitig thermisch geschädigtem Enzym nicht statt. Auch Serumzusatz schützt durch Absorption der schädlichen Strahlen (Thompson **165a**)).

Verschiebungen der Wirkungen bei verschiedenen Amylasen (Malz, Pankreas, Taka) hat bereits Pincussen beschrieben, ebenso Differenzen je nach der analytischen Methode (Jodreaktion, Maltose-Bestimmung), was er auf die verschiedenen Enzyme zurückführte. Nachdem nun die beiden Typen von Amylase sichergestellt sind, darf man solche Differenzen mit Sicherheit erwarten. So gibt Yamashiki (l. c. 147) ebenso wie für andere Einflüsse auch für U-V-Licht an (Takadiastase), daß die Inaktivirung in einer Exponentialkurve verläuft, die durch 2 Linien darstellbar ist, also auf 2 Enzyme deutet: log K = — Ct + C′ (K = Konstante der Reakt.-Geschw., C der Inaktivirung).

Verschiedene Wirkungen der isolirten Strahlengebiete einer Hg-Dampf-Lampe auf Am. (Speichel, Malz) sahen Hutchinson c. s. **166**). Während die Gesamtstrahlung hemmt, wirken die isolirten Gebiete Grün und äußeres UV hemmend, Rot-Gelb und inneres UV aktivirend.

Elektrische Ströme. Nach Yamashiki (l. c. 147) wirken Wechselströme (100 Volt, 35 mA) in analoger Kurve inaktivirend auf Taka-Am. wie U-V-Strahlen. Das **elektrische Feld** eines Solenoids mit Wellen von 50 m hat einen schädigenden Einfluß (bis zur Vernichtung) auf A. des Malzes (Wilke **167**)). Dagegen hat am intakten Korn (Gerste) Mezzadroli **168**) eine Förderung durch Ultra-Kurzwellen beobachtet, bei λ = 2—3 m.

3) Oberflächeneinflüsse, Adsorptionsverhalten.

§ **384.** Diese Frage kann an dieser Stelle, nämlich bei der einfachen deskriptiven Schilderung der Amylase als Enzym, nur ganz kursorisch, resp. ebenfalls nur rein be-

159) ***L. Pincussen, F. di Renzo,*** Ferm. und Licht. IV. Diastase. Bioch. Zs., **144,** 366 (1924). S.A. — 160) ***L. Pincussen,*** Ferm. und Licht V; Diastase. ebd., **144,** 376 (1924). S.A. — 161) ***Ders.,*** dass. VI. ebd., **152,** 405 (1924). S.A. — 162) ***Ders.,*** dass. IX. Diastase IV. ebd., **171,** 1 (1926). S.A. — 163) ***L. Pincussen, S. Kumanomidoh,*** Diastase V. ebd,, **195,** 79 (1926). S.A. — 164) ***L. Pincussen, Y. Kambayashi,*** Wirk. des Lichtes auf Takadiast. etc. Bioch. Zs., **203,** 334 (1928). S.A. — 165) ***L. Pincussen, T. Oya,*** Ferm. u. Licht XIV (Diastase). ebd., **207,** 410 (1929). S.A. — 165a) ***W. R. Thompson, R. Tennant,*** Schutzwirk. bei UV-Bestrahl. auf Amyl. Jl. of gen. Phys. **18,** 675 (1935); Ch. Cbl. **1935, II,** 3119. — 166) ***A. H. Hutchinson, M. R. Ashton,*** Eff. of rad. energy on diastase activ. Canad. Jl. Res., **9,** 49 (1933); BPh **76,** 398. — 167) ***E. Wilke, H. Ganser,*** Einw. el. Wellen auf heterogene Katalyse. Koll. Zs., **70,** 132 (1935); BPh **86,** 180. — 168) ***G. Mezzadroli, E. Vareton,*** Az. delle onde elettr. ultracorte . . . sull. amil. Atti Acc. Lincei (VI), **12,** 594 (1930); BPh **61,** 564.

schreibend behandelt werden. Denn in Wirklichkeit rühren wir hier eigentlich an andere, sehr tiefgreifende Fundamentalprobleme der Enzymlehre. Die Probleme der Oberflächenwirkungen auf die Enzyme sind nur die äußerlichen Exponenten der Probleme der Aktivirung und Inaktivirung der Enzyme überhaupt, soweit sie auf Dispersitätsveränderungen des Trägers beruhen, d. h. wahrscheinlich stets mit Ausnahme der wenigen Fälle, bei denen wir, wie bei der Saccharase, die „Giftwirkungen" direkt auf chemische Wirkungen auf das Agon zurückführen können. Und andererseits stehen diese Wirkungen von Oberflächen im engsten Zusammenhang mit dem „Zustand" der Enzyme in den lebenden Zellen, mit ihrer Eigenschaft als Desmo- oder Lyoenzyme, mit ihrer Aktivirung und Passivirung in der Regulation des Zellstoffwechsels etc. Das sind aber beides Probleme, deren Behandlung dem „Allgemeinen Teil" vorbehalten bleiben muß, da sie bei den Amylasen im Grunde keine anderen sind, als bei den Proteasen, und sie auch bei den Desmolasen in nur wenig veränderter Gestalt wiederkehren. Trotzdem also diese Probleme zum guten Teil grade bei den Amylasen geprüft sind, ist es aus diesem Grunde doch unmöglich, sie hier bei der speciellen Beschreibung des Fermentes Amylase auch nur andeutungsweise im Zusammenhang aufzurollen. Diese specielle Behandlung eines Enzyms bringt es ja notgedrungen mit sich, daß man die allgemeinen leitenden Ideen nicht im Ganzen vortragen, sondern sie nur bruchstückweise grade beim speciellen Thema erwähnen kann. So begegnen wir diesen Oberflächenwirkungen auch hier mehrfach, außer in diesem Abschnitt noch bei der Besprechung der Lyo- und Desmoamylasen, sowie bei der ph-Wirkung, Aktivirung und Hemmung durch Elektrolyte u. a. Stoffe. Das allgemeine betr. müssen wir uns begnügen, hier auf die kritischen Berichte von OPARIN **169)** und v. PRZYLECKI **170)** zu verweisen, in denen auch die an den Grenzen stehenden Arbeiten einerseits mehr kolloidchemischer, andererseits mehr physiologischer Natur referirt sind, die sich nur indirekt den enzymologischen Problemen nähern; so z. B. die Arbeiten v. PRZYLECKI's und seiner Schüler über die Symplexe höherer Ordnung zwischen kolloiden Naturstoffen, wie sie zweifellos auch in den lebenden Zellen vorkommen, und denen wir auch bereits bei den Bemerkungen über Stärke-Eiweiß-symplexe etc. § 372a begegnet sind.

Hier kann uns also nur rein beschreibend das Verhalten der Amylase gegen Adsorbentia beschäftigen, ganz generell und ohne Rücksicht darauf, ob und inwieweit eine solche Bindung an eine Oberfläche die weitere Wirkung hat, daß die Am. inaktivirt wird oder nicht. Darauf kommen wir bei der Frage der specifischen Inaktivirung überhaupt (§ 392) zurück, z. B. der Sisto-amylase. Es ist ja seit dem Beginn der physikalischen Chemie der Fermente bekannt, daß Adsorption ebenso häufig zur Inaktivirung führt wie nicht. Es hängt in der Hauptsache davon ab, ob die Sorption grade die wirksame Gruppe trifft; es ist auch nach PRZYLECKI möglich, daß andere physikochemische Ursachen die Reakt.-Geschw. herabsetzen, wie Verminderung der Diffusionsgeschwindigkeit, Verminderung der gleichzeitigen Adsorption des Substrates an die neuartige Oberfläche u. dgl. Jedenfalls kann auch adsorbirte Am. aktiv sein, wobei wir von den aktiven Desmo-amylasen ganz absehen wollen; es ist recht zweifelhaft, ob bei dieser festen Bindung an Zellkolloide noch von einer „Adsorption" gesprochen werden kann, wenn man nicht eben Adsorption so weitumfassend definirt, daß auch wahre Molekular-bindungen einbegriffen sind. Hier sei also nur ein Überblick gegeben,

---

169) ***A. Oparin,*** Wirk. der Fermente in der lebenden Zelle. Erg. Enzymforsch., III, 57, Leipzig 1934. — 170) ***St. J. v. Przylecki,*** Intracell. Regulirung der Enzymreaktionen mit bes. Berücksicht. der Amylasewirk. Erg. Enzymforsch. IV, 111, Leipzig 1935. S.A.

wie Am. adsorbirt wird, mit einfacher Angabe, ob mit oder ohne Inaktivirung.

Allgemeine Adsorbentia: Auf die Adsorption, soweit sie zur präparativen Darstellung reinerer Amylase-präparate mittels der üblichen Adsorbentia angewendet wird, gehen wir hier natürlich nicht nochmals im Einzelnen ein.

Für die Struktur des Systems „Amylase" ist interessant, daß nach WILLSTÄTTER c. s. (l. c. 3) die Adsorptionsfähigkeit erheblich vom Reinheitsgrad abhängt. Nach Voradsorption wird das gereinigte Enzym auch aus neutraler wäss. Lösung nicht mehr an Tonerde adsorbirt. Es geht dann aber noch an $Fe(OH)_3$, und bei weiterer Reinigung nur noch an BeO (Priv. Mitt. von WALDSCHMIDT-LEITZ). Mit zunehmender Befreiung von Begleitstoffen müssen also die wirksamen Adsorbentien immer basischer sein.

Die Elution von Malzam. aus der Adsorption an Al-Hydroxyd-Gel wird von Salzen sehr verschieden beeinflußt, was von CALDWELL 171) exakt an 13 Salzen untersucht worden ist (Konz. n/10 m), ferner an KOH und NaOH 0,015 m. Größte Ausbeute Di-Kalium-phosphat, kleinste NaCl (636 : 23). Theoretische Erklärung auf grund des Aufbaus des Al-Hydroxyds, das als Ionen-Micell mit je 6 Aquo-gruppen vorliegt. Die Adsorption bedeutet Besetzung dieser Stellen durch das aktive Enzym; die Elution ist Ersatz dieser Enzymgruppen durch die betr. Anionen, und die eluirende Kraft hängt von der Penetrationsfähigkeit der betr. Anionen in das Micell ab.

SABALITSCHKA 172/3) fand die Adsorption von roher Malzam. steigend durch Lindenkohle, Kieselgur, Tierkohle, Kaolin, Tonerde. Das Adsorbat an Kieselgur und Tierkohle ist unwirksam, Tonerde fast unwirksam, Lindenkohle unverändert wirksam. Die Adsorption an Blutkohle und Kaolin nimmt mit sinkendem ph zu von 6,2 bis 4,5, dann bei Kaolin wieder ab, dann tritt die Enzymschädigung auch im Adsorbat stark hervor, bei 2,8 fast völlige Zerstörung. Verschiebung der dextrinirenden und zuckerbildenden Wirkung tritt dabei nicht ein.

Tierkohle adsorbirt ~~rohe~~ Pankreasamylase nach UNNA 174) irreversibel, zunehmend mit steigender Temp.; dieser Vorgang wird nicht durch oberflächen-aktive Stoffe gehemmt. Das Adsorbat ist schwach wirksam auf Stärke, garnicht auf Glykogen. Die schwache Wirkung des Tierkohle-adsorbats fanden auch v. PRZYLECKI c. s. 175) und führen sie auf die räumliche Trennung der Adsorbate von Enzym und Substrat an den Kohle-Oberflächen zurück, auch bestätigen sie die Nichtverdrängung durch Alkohol etc.

BANCROFT 176) fand, daß Glykogen an Tierkohle bis zu einem Gleichgewicht adsorbirt wird. HCl spaltet nur den freien Anteil; Amylase aber nur dann energisch, wenn oberflächen-aktive Stoffe dabei sind. Er denkt an eine Symplex-bindung Kohle-Glykogen-Enzym, in der das Enzym nicht wirkt, die aber durch Butylalkohol etc. zerlegt wird, so daß das Enzym wirksam wird. SIMONOVITS 177) fand demgegenüber durch HCl auch Spaltung des adsorbirten Anteils.

Cholesterol im Gemisch mit Fett und Lecithin adsorbirt unter Inaktivirung (TRUSZKOWSKI 178)); dagegen ist die Adsorption an eine Grenzfläche Öl-Wasser gering (v. PRZYLECKI c. s. 179)). Eine Anreicherung von Milch-Amylase im Rahm hat CHRZASZCZ 180) beschrieben, wahrscheinlich handelt es sich hier auch um adsorptive Vorgänge, aber unter Erhaltung der Aktivität.

---

171) ***M. L. Caldwell, S. E. Doebbeling,*** Infl. of cert. ions upon the extract. of malt amylase from alum. gel etc. Jl. of Biol. Chem., **98**, 553 (1932). S.A. — 172) ***Th. Sabalitschka, C. Schulze,*** Amylase III. Ferm.-Forsch., **8**, 449 (1925). S.A. — 173) ***Th. Sabalitschka, R. Weidlich,*** Adsorpt. der Amylase etc. Bioch. Zs., **210**, 414, **211**, 229 (1929). S.A. — 174) ***Z. Unna,*** Diastase-Adsorption. Bioch. Zs., **172**, 392 (1926). — 175) ***St. J. v. Przylecki, H. Niedzwiecka, Th. Majewski,*** System. . . . polysacch.-amyl.-charcoal. Biochem. Jl., **21**, 1025 (1927). — 176) ***G. Bancroft, E. G. Fry,*** Adsorpt. and hydrol. of glycogen. Jl. of biol. Chem., **100**, 255 (1933). — 177) ***St. Simonovits,*** Adsorpt. und Hydrolyse des adsorb. Glykogens. Bioch. Zs., **277**, 72 (1935). — 178) ***R. Truszkowski,*** System glycogen-amylase-lipoids. Biochem. Jl., **22**, 767 (1928). — 179) ***St. J. v. Przylecki, M. Gurfinkel,*** Struct. and enz. act. VIII (Amylase). Biochem. Jl., **24**, 179 (1930). — 180) ***T. Chrzaszcz, C. Goralówna,*** Milchdiastase. Bioch. Zs., **166**, 172 (1925).

Die Hemmung durch **lipoide Systeme** hat MÜHLBAUER **180a)** untersucht in der Annahme, hier eine Art Modell für die unwirksame Festhaltung der Amylase in den Zellen geben zu können als Erklärung für das, was LESSER die „räumliche Trennung" von Amylase und Glykogen speziell in der Leberzelle genannt hatte. MÜHLBAUER geht davon aus, daß es sich hierbei nicht um eine Adsorption im eigentlichen Sinne handelt, sondern um eine Umhüllung sowohl von Ferment wie von Substrat durch oberflächenaktive Stoffe, die beiden die gleiche Ladung verleiht und sie dadurch von einander trennt. Als Modellsubstanz dient ihm Seife, Na-Oleat. Eine Hemmung durch Seifen ist bereits früher von KENDE angegeben, aber von WILLSTÄTTER als reine Alkaliwirkung festgestellt worden (H.W. S. 700). Auf diese Hemmung durch Seifen stützt sich also auch M. wieder. Er glaubt beweisen zu können, daß beide Komponenten von dieser Hülle eingeschlossen werden, nämlich dadurch, daß Mehrzusatz von Ferment die Hemmung herabsetzt, weil dann eben die Hülle nicht mehr für beide Komponenten ausreicht. Die Hemmung ist abhängig vom ph, sie nimmt ab von ph = 8 ab bis ph = 5, wo bereits die direkte Einwirkung auf das Enzym beginnt. Die Aufhebung der Hemmung ist bedingt durch Unbeständigwerden der Seifenlösung. Ebenso wirken Proteine, die ebenfalls die Seifenlösung zersetzen. Alkohole wirken ebenfalls verringernd auf die Hemmung, weil sie die Umhüllung lockern und sich zwischen Ferment und Substrat schieben. Phosphatide und Cholate wirken ähnlich wie Seifen, aber schwächer, Cholesterol noch schwächer.

Adsorption an Stärke etc. Die Bindung von Am. an rohe Stärke und ihre Wiederablösung durch gelöste Stärke, auch Polyamylosen u. dgl. ist zuerst von AMBARD (*H.W., l. c. 215*) näher untersucht worden. RADAELI **181)** hat diese Frage wieder aufgenommen. Bei diesem Vorgang sind Elektrolyte notwendig und verschieden wirksam, Chloride > Nitrate> Phosphate. Bei saurer Reaktion geht die Bindung besser vor sich als bei alkalischer. Bei Gegenwart von NaCl bindet Reiskleie fast vollständig. Nach BOEKESTEIN **182)** wird an Stärkekörner Malzamylase nicht adsorbirt, wohl aber Pankreasam.

Der Vorgang folgt der FREUNDLICH'schen Isotherme. NaOH-Behandlung der Stärke verstärkt, 1 n HCl vermindert die Adsorption. Die logar. Adsorptions-Isothermen verlaufen bei verschied. ph parallel. In 25 %igem Glycerol bei 0° ist die Kurve eine Grade. Glykogen und Stärkelösung bei Gegenwart von NaCl vermindern die Adsorption wie bei AMBARD, aber auch Zucker wirken derartig, Galactose nicht.

Adsorption an Eiweißfällungen. Eine vollkommen reversible inaktivirende Adsorption an Ausfällungen von Protein in den Malzauszügen u. dgl. selbst haben OPARIN c. s. **183—186)** beobachtet. Wenn man den Auszügen Tannin oder andere eiweißfällende Stoffe wie Coffein oder Hydrochinon zusetzt, wird die gesamte Am. inaktiv an den Niederschlag gebunden, läßt sich aber durch gelöste Proteine oder besser durch Pepton wieder quantitativ eluiren. Dasselbe geschieht spontan beim Aufbewahren gelöster Amylase oder auch von Trockenpräparaten.

180a) ***M. Mühlbauer,*** Modell für die räuml. Trenn. von Ferm.-Substrat in der Zelle. Ferm.-Forsch., **12,** 273 (1931). — 181) ***G. Radaeli,*** Amilasi in pres. di amido crudo. Pathol., **20,** 269 (1928); BPh **47,** 317. — 182) ***P. T. Boekestein,*** Adsorpt. von Amyl. an Stärkekörner. Diss. Amsterdam 1933; Acta brev. neerl. Phys., **2,** 132 (1832); BPh **73,** 337, **76,** 535. — 183) ***A. Oparin, A. Kurssanow,*** Inaktiv. von Ferm. durch Gerbstoffe. Bioch. Zs., **209,** 181 (1929). — 184) ***Dies.,*** ph-Wirkung auf ... Amylase. ebd., **256,** 190 (1932). — 185) ***A. Oparin, S. Manskaja, M. Magaram,*** Einfl. der Koagul. von Eiweißstoffen auf... Amyl. Bioch. Zs., **265,** 21 (1933). — 186) ***A. Oparin, S. Manskaja, I. Glasunow,*** Inaktiv. der Amyl. durch Adsorpt. an Eiweißniederschläge. Bioch. Zs., **272,** 317 (1934).

Endlich kann man durch einfaches Schütteln eine Flockung erzielen, die wieder die gesamte Am. enthält. OPARIN führt auf solche Dispersitätsveränderungen sowohl die Wirkungen von Säuren bis zu ph = 3,5 wie von Elektrolyten wie auch die thermische Inaktivirung zurück (l. c. 142). Diese Adsorption tritt nicht immer ein. Wenn man z. B. denaturirtes elektrolytarmes Eieralbumin mit Am. vermischt und dann mit $CaCl_2$ ausflockt, so nimmt der ausfallende Niederschlag keine Am. mit, wohl aber wenn man leicht ansäuert (**184**). Ebenso fand v. PRZYLECKI **187**) keine Adsorption durch koag. Eiklar bei ph > 6. Wenn man Amylase mit gelöstem Ovalbumin schüttelt, so gehen 30 % Am. in den Schaum; sie ist aber bei kräftigen Schütteln fast voll wirksam (**179**). Es ist aber nicht einmal nötig, den Niederschlag erst in der Enzymlösung selbst entstehen zu lassen. Nach OPARIN c. s. **185/6**) kann man Am. auch an fertig gefälltes Tannalbin oder Protein-nucleinat unwirksam adsorbiren. Auch hier wirken dann gelöstes Eialbumin oder Pepton regenerirend. Das Nucleinat adsorbirt nur unterhalb ph = 4,1, während es bei mehr als 4,7 das Enzym wieder freigibt. OPARIN sieht in diesen Vorgängen Modelle für die Wirkung der natürlichen Hemmungskörper, wie sie CHRZASZCZ als „Sisto-amylasen" beschrieben hat, worauf wir § 392 zurückkommen.

Auch an Leberbrei wird Pankreasam. so fest adsorbirt, daß sie weder durch oberflächenaktive Stoffe noch durch Auswaschen, noch durch Stärke eluirt werden kann. Aber diese sozusagen künstliche Desmo-amylase ist voll aktiv (v. PRZYLECKI **188/189**)). Ebenso adsorbirt Leberbrei aber auch Glykogen (vgl. § 372a); dagegen adsorbirt Myosin Glykogen und Stärke, aber nicht Amylase; wenn sie trotzdem durch Myosin gehemmt wird, so ist das also der Adsorption des Substrates zuzuschreiben (FILIPOWICZ **190**)); ebenso hemmen andere Eiweißkörper die Glykogenspaltung durch Bindung des Glykogens (**189**).

Diese Befunde gehören zu den Studien der Schule v. PRZYLECKI über die Enzymwirkung in dem Drei-Stoffsystem Polysaccharid-Amylase-Protein, in dem beide Reaktionsteilnehmer des Abbaus an das Proteingel adsorbirt sind. Die Amylolyse hängt dann davon ab, wieviel freies Substrat vorhanden ist; das adsorbirte nimmt daran nicht teil. Vorhandene lösliche Proteine haben keinen Einfluß. Wie erwähnt haben Alkohol u. a. Stoffe kaum Einfluß auf die Adsorption des Enzyms, wohl aber verdrängen sie z. T. das Polysaccharid aus der Adsorption. Proteine wirken bei ph < 4,5 hemmend, oberhalb aktivirend; die Hemmung beruht darauf, daß bei saurer Reaktion die Bindung Protein-Stärke irreversibel ist (FILIPOWICZ l. c. 143).

In weiteren Arbeiten wurde der Einfluß von Salzen auf diese Systeme untersucht. CHREMPIŃSKA **191**) fand (Bestimmung der nicht abgebauten Stärke) sehr verschiedene Verhältnisse. Auf die Wirkung der Salze an sich bei Gegenwart von Proteinen werden wir § 389 zurückkommen. Hier nur zur Erläuterung der Bedeutung der Substrat-adsorption der Befund, daß Koagulation einer Mischung Stärke-Eierklar ohne $CaCl_2$ die Wirkung nachträglich zugesetzter Amylase um ca. 50 % herabsetzt, während $CaCl_2$ diese Reaktion sogar noch über die von Stärke + rohem Eierklar erhöht. — Gelatine hindert an sich die Hydrolyse, bei 0,3%iger Stärke bei über 5 % (FREIBERGER **192**)).

Das Eindringen von Amylase in Würfel aus Gelatine + Stärke hat HEUPKE **193**) untersucht, sie verdaut in 24 h 5 mm; es ist dies ein Modellversuch für das Herauslösen der Stärke aus den intakten Pflanzenzellen im Darm (STRASBURGER), vgl. § 401.

---

187) ***St. J. v. Przylecki, R. Majmin,*** (Amylase), cit. n. 170. — 188) ***St. J. v. Przylecki, H. Niedzwiecka,*** System polysacch.-amylase-protein. Biochem. Jl., **22,** 34 (1928). S.A. — 189) ***St. J. v. Przylecki, J. Wójcik,*** System glykogen-amylase-liver tissue. Biochem. Jl., **22,** 1302 (1928). — 190) ***Br. Filipowicz,*** Amylasewirk. bei Myosin-Anwesenheit. Bioch. Zs., **275,** 62 (1934). — 191) ***H. Chrempińska,*** Act. of salts on the systems polysacch.-amyl.-proteins. Biochem. Jl., **25,** 1554 (1931). S.A. — 192) ***S. Freiberger,*** System amyl.-starch-gelatine etc. Biochem. Jl., **25,** 705 (1931). — 193) ***W. Heupke,*** Eindringen der F. in künstl. Membranen. Klin. Ws., **1935,** I, 14; BPh **85,** 637.

II. Chemische Einflüsse.

1) Bedeutung des ph.

§ 385. Nachdem wir über den Abschluß der sozusagen klassischen Periode der ph-Bestimmungen an den verschiedenen Amylasen schon im H.W. S. 690 berichten konnten, haben diese Bestimmungen als Selbstzweck den Hauptteil ihres Interesses eingebüßt. Es tauchen zwar hier und da noch solche Bestimmungen auf, hauptsächlich an anderen Objekten als den üblichen. Aber der Hauptsache nach verfolgen die neueren Arbeiten auf diesem Gebiete weitergehende Zwecke, nämlich die Beziehungen der ph-Aktiv.-Kurven zu anderen Fragen näher zu präcisiren. Es gibt da eine ganze Reihe von Problemen; die wichtigsten sind zwei. Erstens ist selbstverständlich die Bestimmung der ph-Aktiv.-Kurven auch in den Dienst der Sicherstellung und näheren Beschreibung der beiden nunmehr anerkannten Typen von Am., der α- und β-Amylase gestellt worden. Zweitens aber hat man die Einflüsse des ph auf die anders gearteten Erscheinungen der Förderung und Hemmung näher untersucht, vor Allem um deren Wesen zu ergründen. Sobald man die Erscheinungen etwa der Inaktivirung durch Wärme, Strahlung etc., ferner durch Adsorption an Proteine, weiterhin die Beeinflussung durch Neutralsalze, kapillaraktive Stoffe u. v. a. immer mehr auf physikalisch-chemische, besonders kolloidchemische Erscheinungen am weiteren Fermentsystem zurückzuführen suchte, insbesondere also auf Denaturirung, Koagulation und beginnende Hydrolyse des Proteinanteils, war es selbstverständlich, auch der Beeinflussung dieser Vorgänge durch den ph noch mehr Interesse zuzuwenden, als dies schon vorher der Fall war. Weiterhin ist besonders von v. Przylecki (s. l. c. 170) das Augenmerk darauf gelenkt worden, daß nicht nur das Fermentsystem an sich, sondern auch die komplexen Adsorbate, in die auch das Substrat eingeht, die Stärke-Amylase-Proteinsymplexe, erheblich in ihrer Reaktivität vom ph abhängen; denn nach seiner Meinung sind nur die nicht fest adsorbirten Anteile des Substrats der Enzymwirkung zugänglich, und die Festigkeit dieser Bindung resp. die Ausbildung von Gleichgewichten zwischen freiem und adsorbirtem Substrat hängt wieder vom ph ab.

Wie komplicirt die Dinge liegen können, dafür nur ein Beispiel. Eadie (l. c. 206a) fand für isolirte Leberamylase ohne Beimengung von Blutamylase einen opt. ph für Stärkespaltung von 6,0. Er glaubt daraus schließen zu müssen, daß die Leberam. in vivo kaum das lebereigne Glykogen angreifen kann. Er berücksichtigt dabei aber nicht, daß auch die Zugänglichkeit des Glykogens vom ph abhängig ist, und bei 6,0 mehr freies Glykogen vorhanden ist als bei 7,0; es kann also auch bei dem scheinbar ungünstigen ph die Spaltung in vivo besser ablaufen, als beim optimalen für freies Enzym und freies Substrat.

So haben sich diese Untersuchungen sehr weit gedehnt, und es ist schwierig, sie hier alle zusammenzustellen, ohne sich oft zu wiederholen. Es sei von diesen Dingen also hier nur das wichtigste gebracht und im übrigen ein für alle Male darauf verwiesen, daß der Einfluß des ph eben auch an allen den angegebenen Orten nicht unberücksichtigt geblieben ist.

ph-Bestimmungen an den üblichen Objekten: bei Speichelam. Abhängigkeit des ph-Opt. vom NaCl-Gehalt (Ambard **194)**): bei 35 mg % = 6, bei 1 mg = 5,3. Angaben über opt. ph bei verschiedenen Tieren, die keine wesentlichen Besonderheiten zeigen, s. in den § 400

---

194) ***L. Ambard, S. Trautmann,*** Activat. de l'amylase. Soc. Biol., **112**, 1532 (1933); BPh **76**, 535.

Abgeschlossen: 6. 12. 35. Ber. Phys. 88. H. 7/8

citirten Arbeiten. — Pankreasam. etwas abhängig von der Temp.: bis 50° = 7,0—7,2, 60° = 6,7—6,9 (SHERMAN **195**)); Salze verschieben bei zunehmender Konz. fast stets nach alkalisch, z. B. NaCl: 0,0005 m ph = 6,5; 0,1 m ph = 7,1; NaSCN und NaF haben kaum Einfluß (SHERMAN **196**)); vgl. dazu Näheres § 387, besonders MYRBÄCK (l. c. 217). Taka-amylase hat nach IRVIN **197**) einen opt. ph von 4,8—5,0. Nach MASLOW c.s. **198**) Opt. für Verflüssigung bei 4,0 sowohl bei LINTNER-Stärke wie bei Dextrin. Nach CALDWELL **199**) ph. Opt. bei 5,3—5,5 (40', 0,01 m Acetat als Puffer); ebenso OHLSSON **200**) 5,38—5,86; beim reaktivirten Enzym (s. u.) gilt der höhere Punkt (Zuckerbildung), für Jodmethode 4,6 (s. u.).

Malzamylase: Im Gegensatz zu älteren Angaben fand LÜERS **200a**) bei Erhöhung der Temp. für Zuckerbildung (Rohpräparat) keine Verschiebung nach alkalisch, vielmehr Konstanz von 15—70° bei 4,4—4,6. CHRZASZCZ c. s. **201**) fanden dagegen für Dextrinirung wieder Verschiebung mit steigender Temp. nach alkalisch; 20° 4,4, 75° 5,4. Diese Verschiebung des Wirkungsoptimum nach alkalisch ist eine allgemeine Erscheinung, wenn die Bedingungen der Wirkung ungünstiger werden, umgekehrt verschieben günstige Bedingungen nach sauer. Diese Verschiebung mit steigender Temp. fanden auch SHERMAN c.s. **195**). Reinpräparate zeigten bei 40° ein Opt. bei ph = 4,6—4,8, bei 60° 5,3—5,4; bei Acetatpuffer stets 4,6—4,8; in diesem Falle leichtes Absinken bei längerer Wirkung.

Ebenso wird der ph beeinflußt von der Konz. der Puffer. Der oben gegebene ph von ca. 4,5 gilt nur für Acetat bei 0,01 m; bei 0,1 liegt er bei 5,0—5,4. Phosphat ähnlich. Da Phosphat die Zuckerbestimmung stört, wird Acetatpuffer empfohlen (**202**). Auch bei Taka hängt in der Nähe des Opt. die Wirksamkeit vom Puffer ab, es wird auch hier Acetat empfohlen (CALDWELL **199**)).

Amylophosphatase des Malzes und der Gerste hat ihr ph-Opt. bei 5,6 (l. c. 84).

ph-Bestimmungen an neuen oder selteneren Objekten: für Roggen geben NAYLOR c. s. **203**) 3,5—5,0, für Weizen 4,5—5,1 an; für Weizen ebenso 4,6 KARMARKAR **204**).

Amylase von Cholam (*Sorghum vulgare*) für Verflüssigung 4,8 und 6,0; Zuckerbildung 4,3 und 4,9 (ACHARYA, l. c. 95); für Malz aus *Cumbu* (*Pennisetum typhoideum*) 4,6 und 6,2 (**205**). Kartoffel (β-Am.) 6,95—7,0; Zuckerrübenblätter 6,0 (**205a**). Für Batatenknollen (*Ipomoea batatas*) 5,5—6,0 (GIRI, l. c. 103). Kartoffelblätter (l. c. 146b) β-Am. 6,75. Saft von *Ficus carica* 2 Opt. bei 5,3 und 6,3 (ORRÙ **205b**)). — Bei verschiedenen Hefen (§ 399) liegt der opt. ph bei 4,9 (DÜLL **205c**)). — Amylase des Muskels opt. ph 6,3 (BARBOUR **206**)); der Leber, wenn keine Blutam. beigemischt 5,95 (EADIE **206a**)). Amylase der Milch: letzte

195) ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, M. Adams,*** Opt. [H+] for . . . pancr. and malt amyl. Jl. Amer. Chem. Soc., **49**, 2000 (1927). S.A. — 196) ***Dies.,*** [H+] and conc. of salts in . . . pancr. amyl. ebd., **50**, 2529, 2535 (1928). S.A. — 197) ***Roy Irvin,*** Best. der diast. Kraft. Cereal chem., **12**, 142; Ch. Cbl., **1935**, II, 142. — 198) ***H. L. Maslow, W. C. Davison,*** Eff. of [H+] up. the . . . amyl. of Asp. oryzae. Jl. of biol. Chem., **68**, 83, 95 (1926). — 199) ***M. L. Caldwell, M. G. Tyler,*** Influ. of acetate etc. upon amyl. of Asp. oryzae. Jl. Amer. Chem. Soc., **53**, 2316 (1931). S.A. — 200) ***E. Ohlsson, T. Swaetichin,*** Takadiastase. Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 333 (1928). S.A. — 200a) ***H. Lüers, S. Nishimura,*** Einfl. der Temp. auf die opt. [H+] der Amyl. Ws. Brau., **1926**, H. 38. S.A. — 201) ***T. Chrzaszcz, Z. Bidziński, A. Krause,*** Einfl. der Wasserstoffionenkonz. auf die Dextrin. der Stärke etc. Bioch. Zs., **160**, 155 (1925). — 202) ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, H. H. Boynton,*** Infl. of acetate etc. on malt amyl. Jl. Amer. Chem. Soc., **52**, 1669 (1930). S.A. — 203) ***N. M. Naylor c. s.,*** Amyl. from germin. wheat and rye. Jl. Amer. Chem. Soc., **47**, 3037 (1925). — 204) ***D. V. Karmarkar, V. N. Patwardhan,*** Amyl. from wheat. Jl. Ind. Inst. Sci. A., **13**, 159 (1930). — 205) ***D. Narayanamurti, R. V. Norris c. s.,*** Stud. on enz. act. III. Jl. Ind. Inst. Sci., **A 12**, 105 (1934). — 205a) ***G. v. Doby c. s.,*** Kartoffelamylase. — Am. der Zuckerrübenblätter. Ferm. Forsch., **13**, 201, 212 (1932). — 205b) ***A. Orrù,*** Az. del latice del Ficus carica sull' amido. Boll. Soc. Ital. Biol., **5**, 176 (1930); BPh **57**, 569. — 205c) ***A. Düll,*** Diast. bild. Bakt. und Hefen. Zbl. Bact., (2) **88**, 81 (1933). — 206) ***A. D. Barbour,*** Enz. hydrol. of glycogen. Jl. of Biol. Chem., **85**, 29 (1929). — 206a) ***G. S. Eadie,*** Liver amylase. Biochem. Jl., **21**, 314 (1927).

Abb. 45. ph-Aktiv.-Kurve der Saccharogenamylase nach OHLSSON (l. c. 87).

Angabe von KLUGE **206b)** 6,9; frühere 6—6,5 (§ 408). Galle und Pankreas von Seefischen opt. ph = 7,2 (CHESLEY **207)**). — Kristallstylus der Kammuschel *Pecten maximus* opt. ph 6,5 (GRAHAM **208)**); mit steigendem ph steigt die optimale Temperatur; so daß für das bei 13° C. lebende Tier der opt. ph ca. bei 5,8 liegt. Bei dem Copepoden *Calanus finmarchicus* liegt der opt. ph bei 7,2, bei 6,0 schon stark geschwächt (BOND **208a)**); weitere Angaben für Wirbellose § 409.

ph-Aktiv.-Kurven der beiden Amylasen. OHLSSON (§ 379) hatte bereits angegeben, daß seine Saccharogen-amylase (β) ein breites Optimum bei 4,0—5,75, α dagegen ein ph-Opt. von 5—5,6 hat (auch bei Taka). HOLMBERGH **209)** fand dagegen für reine α-Am. aus Malz 4,7—5,2; MYRBÄCK **210)** für reine β 5—6; CREIGHTON (l. c. 94a) für Weizen: α = 4,6—6,3, β = 4,9—5,3.

Abb. 46. ph-Aktiv.-Kurve der Dextrinogen-amylase nach OHLSSON (l. c. 87).

Schädigung durch saure und alkalische Reaktion. Nach YAMASHIKI (l. c. 147) verläuft die Kurve der Inaktivirung genau so wie die der Inaktivirung durch Wärme, Strahlen, el. Strom in einer Exponentialkurve, die auf zwei Enzyme schließen läßt. — Äußerste Wirkungsgrenzen für Taka ph 2—9 (MASLOW, l. c. 198).

TOMIOKA **211)** findet bei Pankreasam. unter der Wirkung von Säuren drei Maxima der Zerstörung bei ph = 1,6, 4,0, > 6,0. Er schließt daraus, daß das Enzym aus drei verschiedenen Anteilen besteht (!).

Weitgehenden Schutz vor ph-Änderungen durch Zusatz von Pepton sah OPARIN **212)** und deutet dies wie bei der Wärme-Inaktivirung und Schüttel-Inaktivirung als Erhaltung des kolloidalen Systems, resp. Verhinderung der Denaturirung. Dasselbe leistet, wie OHLSSON (l. c. 216) und SYM **213)** zeigten, Stärke als Substrat an sich, nach SYM wenigstens gegenüber

---

206b) ***H. Kluge,*** Milchdiastase. Zs. Unters. Lebensm., **65,** 71 (1933). — 207) ***L. C. Chesley,*** Conc. of Proteases, Amyl. etc. in cert. marine fishes. Biol. Bull., **66,** 133 (1934). — 208) ***Al. Graham,*** Style enzyme of Pecten. Proc. Roy Soc., **B 108,** 84 (1931). — 208a) ***R. M. Bond,*** Dig. enz. of the pelagic copepod. Calanus finm. Biol. Bull., **67,** 461 (1934); — 209) ***O. Holmbergh,*** Adsorpt. von α-Amylase. Bioch. Zs., **266,** 203 (1933). — 210) ***K. Myrbäck,*** Gersten- und Malzamyl. Bioch. Zs., **258,** 158 (1933). — 211) ***T. Tomioka,*** Destruct. of amyl. by acids. Jap. Jl. Gastroenter., **1,** 158 (1929); BPh **54,** 230. — 212) ***A. Oparin, A. Kurssanow,*** Wesen der ph-Wirk. auf . . . Amylase. Bioch. Zs., **256,** 190 (1932). — 213) ***E. A. Sym,*** Einfl. des Koll. Zust. . . . auf die . . . . Amylolyse. Bioch. Zs., **251,** 116 (1932). S.A.

den relativ geringfügigen Schädigungen zwischen 3, 6 und 6 (Abb. 47, 48). Die Reaktionsprodukte, einschl. Maltose, schützen nicht. Es ist also der Symplex Amylase-Stärke gegen Säuren weniger empfindlich als Amylase allein. Die Inaktivirung bei ph = 3,6 ist bei ph = 4,7 teilweise reversibel. Ebenso wirkt Stärke schützend auf die wieder vom ph abhängige Hemmung durch

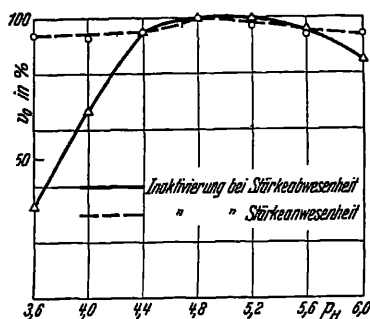



Abb. 47. Der Stärkeeinfluß auf die ph-Inaktivirung (nach Sym 213).

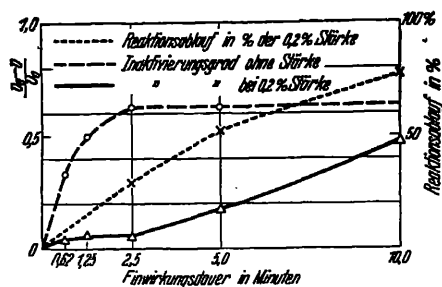



Abb. 48. Inaktiv. der Amylase bei ph = 3,6 mit und ohne Stärke (nach Sym 213).

Salze: im sauren Bereich findet man die Anionen wirksam, bei > 5,5 die Kationen. Die Inaktivirung scheint aus verschiedenen Vorgängen, nämlich langsamen nephelometrisch nachweisbaren Dispersitätsveränderungen und schnellen ionogenen Prozessen zu bestehen.

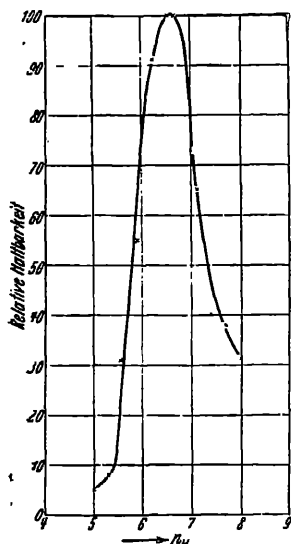



Abb.49. Stabilität der Speichelamylase bei 50° nach Ege 294).

Von einem anderen Gesichtspunkt aus hat Ege **214, 215)** die Inaktivirung der Speichel-amylase untersucht, nämlich um festzustellen, ob sie den Magen passiren und in den Harn übergehen kann (*H.W.* § *400*). Da bei einem einigermaßen günstigen ph die Am. sehr resistent ist, muß man die Versuche zur Bestimmung der optimalen Stabilität bei 50° ausführen, während umgekehrt Einfluß stark saurer Reaktion nur bei niederer Temp. noch zeitlich verfolgt werden kann, da die Inaktivirung sonst zu schnell erfolgt. Oberhalb 3,2 verläuft die Inaktivirung monomolekular, darunter nicht mehr. Eine einfache Beziehung zu dem Dissociationszustand des Enzyms ist nicht aufzufinden. Die Empfindlichkeit der Am. gegen ph < 3 ist so groß, daß sie im Magensaft so schnell vernichtet wird, wie beim Erhitzen auf 100°; bei ph = 3,2 ist die Tötungstemp. nach v. Euler nur noch 19°. Vgl. a. § 400.

Eine Reaktivirung nach der Säureschädigung sah Ohlsson **216)** bei Taka. Sie hängt ab von der Dauer der Inaktivirung und vom ph; sie ist am stärksten zwischen ph 6—7.

2) Anorganische Gifte.

§ 386. Hier ist kaum etwas nachzutragen, wenn wir die hemmende Wirkung bestimmter Ionen bei den Neutralsalzen (§ 387) und die der Schwermetalle einschl. Arsen und Antimon § 388 abhandeln, wie im H.W.

214) ***R. Ege,*** Einfl. der Reakt. auf die Zerstör. des Ptyalins. Bioch. Zs., **244,** 243 (1932). S.A. — 215) ***Ders.,*** Einfl. der Temp. auf die Haltbark. des Ptyalins. Zs. phys. Chem., **224,** 129 (1934). S.A. — 216) ***E. Ohlsson, T. Swaetichin,*** Takadiastase. Bull. Soc. Chim. Biol., **11,** 333 (1928). S.A.

So sei hier nur erwähnt, daß nach MYRBÄCK 217) durch Reaktion mit der basischen Gruppe des Ampholyten (§ 387) die Alkaloidreagentien hemmen (Phosphorwolframsäure etc., auch Picrinsäure), während die Schwermetalle an die Säuregruppe gehen (§ 388). — Perchlorate wirken garnicht, Chlorate hemmen bei Gegenwart von NaCl. — HNO_2 hat keinen erheblichen Einfluß auf salzfreie, mehr auf Salz-amylase.

Jod hemmt nach PRATOLONGO 218) durch direkte Bindung an eine aktive Gruppe (Malz- und Pilzamylase). Monojodessigsäure ist ohne Wirkung (BARTH 219)).

3) Neutralsalze *).

§ 387. Bei der Wirkung der Neutralsalze sind gegenüber der Darstellung im Hauptwerk wesentlich neue Gesichtspunkte nicht hervorgetreten. Die beiden wichtigsten sind nach wie vor die Frage der Salze als „Coferment" einer an sich wenig aktiven Amylase, was in der Hauptsache für die tierischen Am. gilt; und die Frage, ob man von dieser besonderen Wirkung abgesehen die fördernden und hemmenden Ionenwirkungen nur oder ganz betont auf rein dispersoidchemische Einflüsse auf das weitere System, insbesondere die Proteine, zurückführen soll, oder ob und inwieweit noch Einflüsse auf das eigentliche Ferment, d. h. Pheron + Agon, dann also wohl hauptsächlich auf das Pheron zu verzeichnen sind. Andererseits kommen auch dispersoidchemische Einflüsse auf das Substrat in Betracht, resp. auf die komplexen Systeme Protein-Substrat und Protein-Ferment-Substrat. Klar geworden sind diese Grundfragen auch heute noch nicht. Man hat sich mit Erfolg bemüht, den indirekten Einfluß der Elektrolyte auf die sonstigen Milieu-Einwirkungen, wie Temperatur ph, etc. näher kennen zu lernen, so daß es schwierig wird, den Einfluß der Elektrolyte zu schildern, ohne immer wieder auf diese Abschnitte zu verweisen. Aber eine endgiltige Klärung fehlt ebenso, wie die alten Widersprüche uns auch in den neuen Arbeiten begegnen. Es sei versucht, das neue Material einigermaßen sachgemäß zu gruppiren. Da tierische und Malzamylase sich völlig verschieden verhalten, seien sie möglichst getrennt behandelt.

Tierische Amylasen. Die Rolle der **Neutralsalze als „Coferment"** ist eingehend von MYRBÄCK 217) untersucht worden, an Am. von Speichel und Pankreas. Der große Fortschritt dieser Arbeit liegt vor Allem darin, daß mit der alten Annahme endgiltig aufgeräumt wird, als wäre salzfreie Amylase völlig inaktiv, so daß sie des „Cofermentes" überhaupt zur Wirkung bedürfte. Die älteren Angaben beruhen auf Mangel der ph-Kontrolle, und MICHAELIS und PECHSTEIN (*l. c. 273*) sind durch die hier völlig unbrauchbare Jodmethode getäuscht worden. In Wirklichkeit sind die salzfreie Amylase und die verschiedenen „Salzamylasen" verschiedene Abarten des Enzyms Amylase, gekennzeichnet vor Allem durch einen differirenden opt. ph. Die salzfreie Am. hat ihr Opt. bei 6,0, die „Chlorid-amylase" bei 6,8, und die salzfreie Am. hat bei ihrem Optimum 40 % der Wirkung der maximal aktivirten bei 6,8.

Die lange bekannte Aktivirung durch Cl^- ist somit auch quantitativ bestätigt, die optimale Konz. liegt bei 0,01—0,03 m. (ERNSTRÖM, *l. c. 178*). Phosphate haben ebenso wie Sulfate und Acetate im Gegensatz zu MICHAELIS keine Neigung zu einer Kombination mit dem Ferment, die „Phosphat-amylase" etc. existirt nicht. Das ph-Opt. der Chlorid-amylase von 6,6—6,8 nach MICHAELIS wird bestätigt (ERNSTRÖM fand 6,5); salzfreie

*) Einige „Nachträge" zu §§ 387 u. ff. s. am Schluß des IX. H. T. hinter § 424.

217) ***K. Myrbäck,*** Verbind. ein. Enz. mit inaktivir. Stoffen. Zs. phys. Chem., **159,** 1 (1926). S.A. — 218) ***U. Pratolongo,*** Aggruppam. attivi dei prepar. enzim. etc. (Amylase) Ann. Labor. Ric. Ferm. Spallanz., I, **77** (1930). — 219) ***F. Barth,*** Wirk. von Monojodessigs. auf Diastase etc. Bioch. Zs., **270,** 63 (1934).

Am. mit und ohne Phosphatpuffer ist bei 6,7 unwirksam, bei 6,0 mit 40 % wirksam. Der Aktivirungsgrad ist somit stark vom ph abhängig. Bei ph = 5 steigt die Wirkung durch NaCl von 35 auf 52, bei 7,5 von 6 auf 74 (Abb. 50).

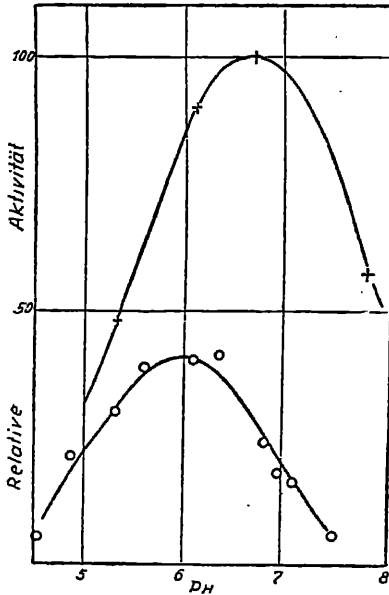



Abb. 50. ph-Aktiv.-Kurven der salzfreien (o) und der durch Cl^- aktivirten Amylase (+) nach MYRBÄCK 217).

A c e t a t wirkt überhaupt nicht; S u l f a t ist wirkungslos auf Chlorid-amylase, salzfreie hemmt es erst > 0,1 n. Bei der Chlorid-amylase steigt die Aktivität bis zu einem Zusatz von 0,01 n, um dann stationär zu bleiben (Abb. 51); daraus berechnet sich die Affinitätskonstante Enzym-Cl^- zu 0,0009. Zu NO_3^- hat die Am. eine sehr starke Affinität (MICHAELIS); die Nitrat-amylase hat ein ph-Opt. von 6,9—7,0, ihre Aktivität bei diesem ph ist etwa gleich

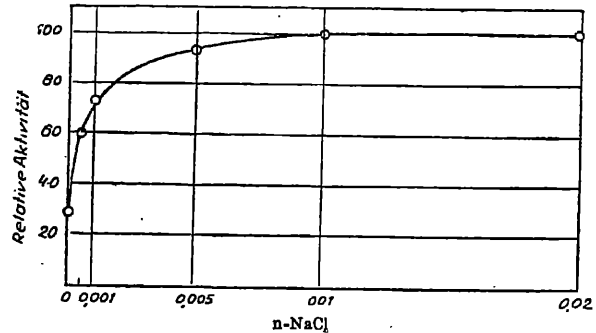



Abb. 51. Abhängigkeit der Amylase von der Cl-Konz. nach MYRBÄCK 217).

der der salzfreien Am. bei deren Optimum. Da also Nitratam. weniger wirksam ist bei gleichzeitig stärkerer Affinität, so h e m m t sie die Chlorid-am.; und da sie ein höheres ph-Opt. hat, so hemmt sie salzfreie Am. bei ph < 6,5 und aktivirt > 6,5. Damit sind die vielen Widersprüche geklärt. Bei 0,1 n. Nitrat ist das gesamte Enzym gebunden, die Affinitätskonstante ist = 0,0055, die Affinität ist also — im Gegensatz zu MICHAELIS — g e r i n g e r als zum Cl^-. — $KClO_3$ hemmt beim opt. ph die Chloridamylase, kann unter anderen Bedingungen auch aktiviren; $KClO_4$ ist ohne Wirkung. ClO_3^- hat etwa dieselbe Affinität wie NO_3^-. Br^- und J^- verhalten sich ganz ähnlich wie Cl^-. F^- hemmt meist stark, weil die käuflichen Salze stark s a u e r sind; in Wirklichkeit ist das F-Ion u n w i r k s a m. Die Kurventafel (Abb. 52) gibt die ph-Aktiv.-Kurven aller untersuchten Salzamylasen wieder. Ungemein wichtig ist die Feststellung, daß die verschiedenen Aktivitäten n i c h t auf verschiedenen Affinitäten zum Sub-

Abb. 52. ph-Aktiv.-Kurven verschiedener Salzamylasen nach MYRBÄCK 217).
I: salzfreie Amylase. II: Chloridamylase. III: Bromidamylase. IV: Jodidamylase. V: Nitratamylase. VI: Chloratamylase.

strat beruhen, da z. B. Cl- und NO_3-Am. bei 1% Stärke maximal wirken, und überhaupt das Verhältnis der R.-Geschw. von der Substratkonz. unabhängig ist; auch die Kinetik ist die gleiche. Amylase ist ein Ampholyt (§ 376); die Elektrolyte schwächen die sauren, verstärken die basischen Eigenschaften; im ersten Fall wirkt am stärksten Cl^-, im letzteren I^-. Die Salzamylasen entstehen durch Anlagerung sowohl des Anions wie des Kations; in welcher Art, ist bisher nicht auszusagen. Bei dem Glykogen zum Trisaccharid aufspaltenden Enzym des Muskels (§ 368) fand BARBOUR (l. c. 206) Chloride und Phosphate fördernd.

Harn-amylase verhält sich nach NØRBY (l. c. 146) in bezug auf die Bedeutung des Cl^- wie die des Speichels. Die Bindung von Cl^- an das Enzym, weniger von $[NO_3]^-$, garnicht von Phosphat und Sulfat, ist von OMORI 220) durch direkte Messung der betr. Ionen, potentiometrisch und conductometrisch, gezeigt worden. — Über die Beeinflussung des Temperaturkoefficienten durch die Konz. an $[Cl^-]$ und die theoretische Ausdeutung der Ionenwirkung überhaupt s. § 382.

Im Gegensatz zu dieser Anschauung, daß der Ampholyt an seinen beiden Polen Kation und Anion des Salzes getrennt bindet, nimmt AMBARD 221) an, daß nur $H+$ und $Cl-$ als „Ionenpaar" dann die Aktivirung vollziehen, wenn sie sich treffen. Sie schließen dies aus den ph-Verschiebungen durch verschiedene Konzz. von NaCl (l. c. 194), sowie Abhängigkeit der Adsorption an Stärke vom ph und der Konz. an NaCl; bei Abwesenheit von NaCl stärkste Bindung bei ph = 5,28, bei 1 % NaCl von 5,28—7,16. Aus Versuchen an roher Kartoffelam. will JAMES 222) schließen, daß KCl zu 0,19 % nur die Dextrinirung, nicht die Zuckerbildung aktivirt, und daß somit 2 Fermente existiren.

Zur Frage nach den **allgemeinen Mechanismen** der Salzwirkungen: BROEZE 223) fand eine Aktivirung durch alle Elektrolyte (viscosimetrisch, Speichelam.) schon durch minimale Konzz. (0,5 Milli-aequivalent). Dabei zeigt sich kaum eine Lyotropie der Kationen, etwas stärker der Anionen. (Cl > NO_3 > CNS); SO_4'' fällt aus der Reihe. Mehrwertige Anionen aktiviren stärker. Da auf Stärke erst höhere Konz. in der Richtung einer Viscositätsminderung wirken, nimmt BROEZE eine direkte Wirkung auf das Enzym an.

SHERMAN c. s. 224) fanden bei Pankreasam. eine der HOFMEISTER'schen Reihe folgende Lyotropie der Anionen — mit Ausnahme des Sulfats, das überhaupt unwirksam ist —, wenn sie jedes Salz bei dem ph untersuchten, der grade für dieses Salz optimal ist (l. c. 196). Es ergibt sich für die Aktivirung dann die Reihenfolge absteigend: NaCl, KCl 100, LiCl ca. 85, NaBr 77, $NaNO_3$ 41, $NaClO_3$ 29, NaCNS 29, NaF 24, Sulfat Null. (Jodide nicht untersucht, da sie stets freies Jod enthalten.) Die Salze mit schwachen Anionen (Acetat, Borat, Citrat, Phosphat) sind bei ph = 7,0—7,2 und Konzz. von 0,05—0,001 m ohne Einfluß (225).

Tabelle der Wirkungen bei verschiedener Konz. mit dem dazugehörigen opt. ph nach 224).

Salt	Optimal conc., *M*	Optim. *ph*
Sodium chloride	0.02—0.05	7.1—7.2
Potassium chloride	.03— .05	7.1—7.2
Sodium bromide	.03— .20	7.1
Sodium nitrate	.10— .20	7.1
Sodium chlorate	.10— .20	6.9—7.1
Sodium sulfocyanate	.15— .20	6.7—6.8
Sodium fluoride	.20— .30	6.7—6.8

220) ***T. Omori***, Einfl. der Chlorionen auf Speichelamyl. Jl of Biochem., **14**, 339 (1931). — 221) ***L. Ambard, S. Trautmann***, Rôle associée des ions H+ et Cl^- dans l'activ. de l'amyl. Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 1272 (1933). — 222) ***W. O. James, M. Cattle***, Influ. of KCl on ... diast. hydrol. of starch. Biochem. Jl., **27**, 1805 (1933). — 223) ***J. R. Broeze***, Einw. von Ptyalin auf Stärke II. Bioch. Zs., **231**, 365 (1931). S.A. — 224) ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, M. Adams***, Infl. of ... neutral salts on ... pancr. amylase. Jl. Amer. Chem. Soc., **50**, 2535, 2538 (1928). S.A. — 225) ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, J. E. Dale***, Infl. of sodium acetate etc. upon pancr. amyl. ebd., **49**, 2596 (1927). S.A.

Da SHERMAN ausdrücklich angibt, daß er dieselben Werte für „gereinigte" wie für käufliche Präparate fand, so wird es sich hier tatsächlich viel weniger um Wirkungen auf das Ferment, als um Einflüsse auf Begleitstoffe handeln, daher wahrscheinlich die betonte Lyotropie. SHERMAN selbst nimmt freilich auch specifische Einflüsse an.

§ 388. Wirkung einzelner Ionen: Anionen. Bzgl. der Halogene gibt CLIFFORD **226)** an, daß Br′ und J′ ohne Einfluß auf Speichelam. sind, CaJ_2 soll hemmen (Kationwirkung?). Demgegenüber findet bei demselben Enzym FRICKER **227)** KBr und KI hemmend.

Fluoride: CLIFFORD **226)** macht die sehr unwahrscheinliche Angabe, daß NaF ohne Einfluß ist, dagegen KF stark hemmt, ebenso NH_4F, was als Kation-Wirkung erklärbar wäre. (Nach MYRBÄCK **217)** ist das Fluor-Ion ohne Einfluß; wahrscheinlich war das von CLIFFORD verwendete KF sauer.) — Nach DOBY (l. c. 205a) aktivirt NaF Kartoffelam. im Brei selbst am stärksten von allen Anionen bei 0,001—0,1 n; ebenso die der Kartoffel blätter (l. c. 146b); bei 0,1 und Vollernährung hemmt es hier.

Phosphate sind im Allgemeinen gleichgiltig (vgl. bei MYRBÄCK **217)**); eine Ausnahme bilden zwei Lyo-Amylasen der Leukocyten und die entspr. Desmo-amylasen, die ohne Phosphorsäure überhaupt nicht wirken (§ 376); hier handelt es sich wahrscheinlich garnicht um eine Aktivirung, sondern es gehört die PhS zum System.

Thiocyanate aktiviren tierische Amylasen besonders bei Gegenwart von NaCl (BITTORF **228)**. Rohe Kartoffelam. (die der tierischen nahesteht, *l. c. 294a*) wird durch geringe Konzz. nicht beeinflußt, größere hemmen: im Sauren hemmen sie stets, auch Pankreas und Malz, bei höherem ph können sie fördern oder schwach hemmen. KCN soll fördern Kartoffelsaft), vielleicht durch Ausschaltung zerstörender Oxydasen (DENNY **229)**). Aktivirung von Speichelam. auch JOHNSON **230)** und MILLER **231)**; letzterer aber auch nur bei Abwesenheit von NaCl, und nur bei höherem ph, gemessen durch Viscosität, Jodreaktion und Zuckerbildung.

Kationen. Ca soll hemmen (CLIFFORD **226)**); diese Angabe ist zweifellos falsch. Nach WILLSTÄTTER **232)** ist Ca auf alle tierischen Amylasen beim opt. ph ohne Wirkung, außer auf α-Lyo-amylase der Leukocyten (jetzt als IV bezeichnet, § 376); WALDSCHMIDT-LEITZ **233)** fand bei abweichendem ph (5, resp. 8,5) eine Förderung (vgl. § 392).

Für die Chloride gibt für Aktivirung der Pankreasam. TOMIOKA **234)** die Reihenfolge absteigend: Mg, Alkalien, Ca, Ba, Al. Alkalien und Ca wirken bei gleicher [Cl′] (potentiometrisch gemessen) genau gleich. — Auch WALTON **235)** fand NaCl, KCl, NH_4Cl gleich wirksam. Über die aktivirende Wirkung von Thermal- und Mineralwässern s. **236)**, **237)**.

§ 389. Wo diese Frage der tatsächlichen „Komplettirung" der elektrolytarmen Am. keine Rolle spielt, wie bei käuflicher **Malzamylase**, liegen die Dinge natürlich ganz

---

226) ***W. M. Clifford,*** Eff. of halogen salts on saliv. dig. Biochem. Jl., **19**, 218 (1925). — 227) ***E. Fricker,*** Einfl. von KBr und KJ auf die diastat. Wirk. Schweizer. Med. Ws., **1925**, H. 38. S.A. — 228) ***A. Bittorf, M. v. Falkenhausen,*** Bezieh. des Rhodankal. zur Diastasewirk. Arch. für exp. Path., **115**, 9 (1926). — 229) ***F. E. Denny,*** Eff. of thiocyan. upon amyl. Contr. Boyce Thompson Inst., **3**, 277, 297 (1931), **5**, 441 (1933); BPh **65**, 301, **77**, 323. — 230) ***L. R. Johnson, A. Wormall,*** Potass. thiocyan. and diast. act. etc. Proc. Leeds Phil. Soc., **1**, 318 (1924), cit. n. 231. — 231) ***L. P. Miller,*** Eff. of thiocyan. upon amyl. Contr. Boyce Thompson Inst., **3**, 287 (1931). S.A. — 232) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Amyl. der Leucocyten. Zs. phys. Chem., **203**, 189 (206) (1931). S.A. — 233) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Amylokinase. ebd., **213**, 63 (1932). — 234) ***T. Tomioka,*** Activ. of amyl. by chlorine ions. Jap. Jl. Gastroenter., **1**, 208 (1929); BPh **54**, 674. — 235) ***J. H. Walton, H. R. Dittmar,*** Hydrol. of corn-starch by . . . pancreatin. Jl. of biol. Chem., **70**, 713 (1926). — 236) ***M. Loeper, A. Mougeot,*** Les eaux minér. . . . act. activ. sur les amyl. ? Soc. Biol., **92**, 569. — 237) ***Schober,*** Amylolyse aktiv. Eigensch. von Thermal- und Mineralw. Zs. wiss. Bäderkunde, **2**, 776; BPh **47**, 154 (1928).

anders, wie bereits im H.W. S. 697 berichtet. Nur wenn man Malzam. durch energische Eingriffe fast elektrolytfrei herstellt, treten etwa dieselben Erscheinungen auf. Die Differenzen zwischen Malz- und tierischen Am. sind also nicht etwa auf innere Verschiedenheiten von α- und β-Am. zu beziehen, zu einer Unterscheidung dieser Enzym abarten reichen die Abweichungen nicht aus.

Bei Diastase-MERCK fand neuerdings wieder eine Hemmung durch Salze (Abnahme der Stärke als Maßstab) CHREMPIŃSKA **238)** im Rahmen der Studien der Schule v. PRZYLECKI's über die Enzym-Substratsysteme. Die Hemmung ist grösser bei niederem ph als dem optimalen; bei höheren treten Wirkungen der Valenz differenzirend auf. Sobald man aber Eiweiß hinzufügt, ändern sich die Verhältnisse. Gelatine wirkt so, daß Ca hemmt, Na nunmehr fördert, beide als Chloride. Bei Ovalbumin und rohem Eierklar wirken weder NaCl, noch Na_2SO_4; $CaCl_2$ aktivirt, aber nur durch Verschiebung des ph ins Saure. Wenn man das Eierklar koagulirt, tritt ebenfalls eine Verstärkung durch $CaCl_2$ auf, die wahrscheinlich eine „Desorption" der Stärke vom Protein darstellt (vgl. § 384). BAUMGARTEN **239)** hat mit Zuckerbestimmung an Takadiastase und Malz etwa dieselben Ergebnisse erzielt. Na_2SO_4 ist ohne Wirkung. $CaCl_2$ aktivirt Taka sehr stark bei ph = 8,85, hemmt bei 4,7. Umgekehrt NaCl. $CaCl_2$ wirkt auch hier nur säuernd.

HARADA **240)** fand bei nur oberflächlich gereinigter Amylase Na-Phosphat und Al-Sulfat stark hemmend, $CaCl_2$, Na_2SO_4 und Citrat nur in höherer Konz.; NaCl, KCl fast ohne Einfluß. Dagegen fanden SHERMAN c. s. **241)** bei gereinigten Präparaten von Malz-am. eine Förderung insofern, als NaCl etc. bei 40° bei ungünstigem ph (sowohl 4,0 wie 5,5) die Minderwirkung fast völlig ausgleichen, so daß das Enzym wie ohne Salz bei 4,5 wirkt. Höhere Konzz. wirken bei weniger saurem, kleine bei saurem ph besser. SO_4'' und NO_3' wirken schwächer als Cl'.

Die „Salzhydrolyse". Über die Vorstellungen von BIEDERMANN und HAEHN ist im H.W. S. 695 gesprochen worden, die Annahme, daß Elektrolyte an sich das Stärkeaggregat aufspalten, und die Amylase diese Wirkung nur verstärkt. Soweit es sich nur um Verkleinerung des Molates handelt, wäre dieser Vorgang möglich, er ist aber nicht erwiesen, und eine Trennung der Hauptvalenz-bindungen ist durchaus unwahrscheinlich. Zwar hat HAEHN **242)** noch einmal diesbzgl. Angaben gemacht. Er fand in angeblich sicher sterilem Milieu einen Abbau zu Zuckern durch ein System Salz-Aminosäure-Pepton bei Gegenwart von Sauerstoff, allerdings nur bei enormen Mengen von „Katalysator" (1,16 g auf 12 g Stärke). Amylopectin wird nicht angegriffen. Antioxygene (Phenole) hemmen.

Später konnte aber kein Nachuntersucher die „Salzhydrolyse" finden, wenn die Lösungen steril waren **(243—248)**. GLIMM **245)** nimmt an, daß die Fehlergebnisse auf Infektion durch einen Schimmelpilz *Pediococcus* zurückzuführen sind, der sich häufig im Pepton findet, einfaches Kochen verträgt und Stärke abbaut; YASUDA **248)** hat aus den Gemischen ein Bakterium in Reinkultur isolirt, das bei Salzanwesenheit Stärke spaltet. Der Sauerstoff ist also für die Bakterien, nicht für die Hydrolyse notwendig. Auch bei feinster Zermalmung tritt kein hydrolytischer Abbau auf (LÜERS, § 374).

---

238) ***H. Chrempińska,*** Act. of salts on the system amylase-starch-proteins. Biochem. Jl., **25,** 1555 (1931). S.A. — 239) ***G. Baumgarten,*** Act. of salts on the system amylase-starch-proteins. ebd., **26,** 539 (1932). S.A. — 240) ***K. Harada,*** Spalt. der Stärke durch Amyl. Jl. of Biochem., **4,** 123 (1924). — 241) ***H. C. Sherman, M. L. Caldwell, M. Cleaveland,*** Infl. of cert. neutral salts upon malt amyl. Jl. Amer. Chem. Soc., **52,** 2436 (1930). S.A. — 242) ***H. Haehn, H. Berentzen,*** Stärkeabbau durch das System Neutralsalze etc. Chemie der Zelle, **12,** 286 (1925); BPh **35,** 340. — 243) ***K. Takane,*** Vermeintl. Hydrolyse der Stärke durch Salze etc. Bioch. Zs., **175,** 241 (1926). — 244) ***E. Schneider,*** Beeinfl. des Stärkeabbaus durch Röntgenstrahlen. Strahlenther., **23,** 326 (1926); BPh **38,** 879. — 245) ***E. Glimm, R. Grimm,*** Salzhydrol. der Stärke. Bioch. Zs., **197,** 445 (1928). — 246) ***N. Ivanovskij,*** Salzhydrol. der Stärke. Ž. eksp. Biol. (russ.), **10,** 292 (1928); BPh **48,** 471. — 247) ***N. Malyschev,*** Salzhydrol. der Stärke. Bioch. Zs., **206,** 401 (1929). — 248) ***M. Yasuda,*** Salzhydrol. der Stärke. Jl. of Biochem., **10,** 259 (1929).

4) Schwermetalle.

§ 390. Im Anschluß an die älteren Arbeiten der Stockholmer Schule (*l. c. 307*) hat MYRBÄCK (l. c. 217) wie bei der Saccharase nachgewiesen, daß sich die Metalle quantitativ stöchiometrisch an Carboxyle binden. Die Reihenfolge der hemmenden Wirkung ist hier abnehmend Cu, Hg, Ni, Cd, Co, Pb, Mn. Dies gilt für Speichel und Pankreas, bei Malz liegen die Verhältnisse nicht so klar, neben der Bindung an die Säure kommt noch eine andere, durch den ph weniger beeinflußte, in Frage.

Ag wird nach PRATOLONGO (l. c. 218) (wie bei unreiner Saccharase) hauptsächlich an inaktive Gruppen gebunden, Hg an aktive Gruppen (Malz- und Pilzamylase), in stöchiometrischen Verhältnissen. Bei der Bindung an Carboxyl treten formoltitrirbare Aminogruppen auf. Kupfer fand TEMMINCK GROLL **249)** bereits bei 10^{-5} m stark hemmend, ebenso Hg.

Zinksalze wirken auf Speichelam. bald hemmend, bald aktivirend, je nach Konz. und ph (**250**). Bei $>$ 0,05 n nur Hemmung, bei 0,0001 m unterhalb ph $=$ 6 Aktivirung, oberhalb Hemmung. Maximale Aktivirung: 0,0025 bei ph $=$ 4,8. Bei Taka fand NISHIKAWA **250a)** Fe, Ni, Co, Cu ohne Einfluß, Zink schädigt, ebenso Hg, HCN reaktivirt.

Tartarus stibiatus (K-SbO-Tartrat) auf Speichelam. bei konstanter Reaktion ohne Einfluß (**251**), ebenso Arsenate, während Arsenite etwas hemmen. Alles dies gilt für gut gepufferte Lösungen. Wo sonst Hemmungen auftreten, liegen sie an der Verschiebung des ph durch diese Salze; genauere Feststellung der Pufferungskapacität von Arseniten und Arsenaten **252**).

5) Organische Stoffe.

§ 391. Die Beeinflussung durch organische Stoffe ist meist vom pharmakologischen Standpunkt aus untersucht worden, also mit dem Ziele einer Prüfung nicht nur des Fermentes an sich, sondern seiner biologischen Funktion; daneben laufen natürlich wieder die üblichen Untersuchungen über kapillaraktive Stoffe in ihrem Einfluß auf das System Enzym an sich. Da bestimmte Richtlinien sich nicht ergeben haben, bleiben wir am besten bei einer rein systematischen Anordnung.

Einfache N-freie Stoffe. Aethylen und Aethylen-Chlorhydrin sind im Hinblick auf ihre Wirkung als Frühtreibmittel von ENGLIS **253)** resp. von DENNY **254)** geprüft und unwirksam befunden worden. Verstärkung der Amylasewirkung durch Behandlung der Samen selbst (NORD), s. § 394. Alkohol hemmt bei ph 4,5 um 3,7 %, bei 7,5 um 28,7 % (FILIPOWICZ **255**)), Glycerol hemmt einige der Leucocyten-amylasen (WILLSTÄTTER, § 376), Pankreasam. wenig, sie wird aber durch wasserfreies Glycerol ziemlich schnell irreversibel zerstört (**256**). Aceton wirkt bei der Trocknung von Organen vermindernd auf die Am. durch Denaturirung des Trägers (**256a**). Formaldehyd wirkt fördernd, in höheren Konz. hemmend (SABALITSCHKA **257**)), andere Aldehyde nur schwach hemmend. Ungesättigte Fettsäuren

---

249) ***J. Temminck Groll,*** Invl. van aminozuren op ... Speekselamyl. Pharm. Weekblad, **65**, 1315 (1928). — 250) ***M. Andreitscheva,*** Infl. des sels de zinc sur ... diastase saliv. Bull. Soc. Chim. Biol., **16**, 1756 (1934); BPh **87**, 176. — 250a) ***K. Nishikawa,*** Takadiastase. Biochem. Zs., **188**, 386 (1927). — 251) ***J. A. Smorodinzew, Fr. E. A. Iljin,*** As und Sb-Verbind. auf ferm. Funkt. etc. IV, V (Amylase). Bioch. Zs., **185**, 328 (1927), **201**, 34 (1928). — 252) ***A. N. Adowa, J. A. Smorodinzew,*** As- und Sb-Verbind. auf ferm. Funkt. etc. VII. ebd., **232**, 459 (1931). — 253) ***D. T. Englis, C. D. Zannis,*** Eff. of ethylene upon ... diast. etc. Jl. Amer. Chem. Soc., **52**, 797 (1930). — 254) ***F. E. Denny,*** Eff. of ... ethylene chlorhydr. upon amyl. Contr. Boyce Thompson Inst., **5**, 441 (1933); BPh **77**, 323. — 255) ***Br. Filipowicz,*** Infl. of proteins etc. on enz. hydrol. of starch. Bioch. Jl., **25**, 1874 (1931). — 256) ***R. Willstätter, M. Rohdewald,*** Pankr. Amylase. Zs. phys. Chem., **221**, 202 (1933). S.A. — 256a) ***Dies.,*** Zur enzymchem. Meth. ebd., **229**, 241 (1934). S.A. — 257) ***Th. Sabalitschka, C. Schulze,*** Malzamylase IV. Ferm. Forsch., **8**, 428 (1925). S.A.

(gesättigte nicht) fördern nach CAMERON 258) (Oleate bei ph = 6,7, Speichel), ebenso Galle; von isolirten Bestandteilen nur Taurocholat, Cholat hemmt, Cholesterol ohne Einfluß. Als Einflüsse auf das Substrat deutet BORISSOVSKY 258) die von ihm gefundene Hemmung durch gesättigte niedere Fettsäuren (C_5—C_7) durch Adsorption dieser oberflächenaktiven Stoffe an die Oberfläche des Stärkekorns mit Abdrängung des Enzyms; vgl. dazu MÜHLBAUER (l. c. 180a).

Milchsäure fördert den Glykogenabbau durch Leberextrakt (PARTOS 260)), ebenso nach OHLSSON 261) Citronensäure die Pankreasamylase, aber nur beim opt. ph, und wenn kein NaCl zugesetzt wird; abseits vom opt. ph hemmt sie; auf Taka beim opt. ph ohne Einfluß, bei höheren ph Hemmung.

Stickstoffhaltige Stoffe sind aus physiologischen Motiven vielfach untersucht worden.

Freie Amine der Alkyle hemmen nach CAUJOLLE 262) (Speichel, Pankreas), bei gleicher Konz. um so stärker, je kleiner das Molgew. ist; die Chlorhydrate fördern, auch die Hemmung ist durch Zusatz von HCl zu beseitigen; analog Cholin, Tetramethyl-ammonium-hydroxyd (263); Diamine hemmen schon zu 0,005 %, Dichlorhydrate fördern, Monochlorhydrate ohne Wirkung (264). Chlorhydrate aller Amine aktiviren um so stärker, je schwächer das Enzym nach Erwärmung. $[NH_4]Cl$ wirkt garnicht, so daß ein specifischer Einfluß der komplexen Kationen angenommen wird. Da aber sämtliche Versuche ohne Puffer und ohne ph-Messung angestellt sind, so dürften die Wirkungen samt und sonders auf Verschiebungen des ph durch die freie Base oder das hydrolytisch zerfallene Chlorhydrat zu beziehen sein. — Amine fand auch FILIPOWICZ 255) hemmend.

Blausäure scheint nach LÜERS (l. c. 40) die verzuckernde Wirkung, nicht die verflüssigende zu hemmen.

Aminosäuren sind schon früher (H.W. S. 701) als Förderer der Amylasewirkung festgestellt worden. Es liegen dazu einige neuere Angaben von TEMMINCK-GROLL, sowie der Schule v. PRZYLECKI vor. — Über die Schutzwirkung von Aminosäuren s. § 382.

TEMMINCK-GROLL (l. c. 249) konnte die Ergebnisse SHERMANS (*l. c. 331*) bei ebenfalls ausreichender Pufferung nicht bestätigen; er fand (Speichel) überhaupt keine Einwirkung, nur bei Prolin bisweilen eine Hemmung, wenn wegen dessen alkalischer Reaktion die Pufferung nicht ausreichte. Auch nach MYSTKOWSKI 266) hat Glykokoll beim opt. ph garkeinen Einfluß, bei ungünstigem ph fördert es, aber nie über die Wirkung hinaus, die das Enzym ohne Zusatz beim opt. ph hat. $CaCl_2$ hebt auch diese Wirkung auf. Bei pflanzlicher Amylase steigt die Förderung mit dem ph an, bei tierischer sind 2 Maxima bei 4,5 und 8,2 vorhanden. Es soll sich dabei um einen Schutz des Fermentes vor Zerstörung handeln. Daneben kommt noch die Möglichkeit in Betracht, daß Aminosäuren ebenso wie Peptone das Enzym aus einer inaktiven Bindung im natürlichen Milieu eluiren, wie CHRZASZCZ es sich vorstellt (§ 392); Peptone sind an sich unwirksam und sollen nur diese Wirkung einer „Eleutoamylase" haben.

Ähnlich wirkt Kreatinin, während Kreatin und Guanidin hemmen (MYSTKOWSKI 267)); (Guanidin zu 0,04—0,2 %). CAMERON (l. c. 258, III) hatte Kreatinin unwirksam befunden, ebenso Harnstoff, während Harnsäure schwach fördern soll. Nach FILIPOWICZ 268) sind

---

258) ***G. Cameron,*** Stud. on diast. activity. I—III. Jl. of metabol. res., **5**, 205, 229, 243 (1924); BPh **38**, 130. — 259) ***V. Borissovsky, N. Wwedensky,*** Einfl. organ. Fettsäuren auf den Spaltungsproz. der Stärke. Bioch. Zs., **219**, 72 (1930). — 260) ***A. Partos,*** Regul. des Kohlenhydratstoffw. II. Ferm. Forsch., **10**, 50 (1928). — 261) ***E. Ohlsson,*** Infl. des citrates sur l'hydrol. enz. de l'amidon. Arch. internat. pharm., **37**, 98 (1930). S.A. — 262) ***F. Caujolle, J. Molinier,*** Infl. des amines grasses . . . sur l'activ. amylol. C. R., **190**, 695 (1930); Bull. Sci. Pharm., **37**, 290 (1930). — 263) ***Dies.,*** Infl. de l'hydrate de tetramethylamm. etc. sur l'activ. amyl. etc. Soc. Biol., **104**, 294 (1930). — 264) ***F. Caujolle, P. Roche, (S. Lafitte),*** Rech. sur les amyl. IV—VI. Bull. Sci. Pharm., **39**, 361 (1932), **40**, 167, 213 (1933). — 266) ***E. M. Mystkowski, M. Landau,*** Amylasewirkung. Bioch. Zs., **261**, 116 (1933). S.A.; ***M. Landau*** (poln.) BPh **81**, 658. — 267) ***E. M. Mystkowski,*** Infl. of guanidine etc. on . . . amylase. Biochem. Jl., **26**, 910 (1932). — 268) ***Br. Filipowicz,*** Wirk. chem. Muskelkompon. auf die Amyl. Bioch. Zs., **275**, 56 (1934).

reine Nucleotide ohne Einfluß, ebenso Muskelextrakte. Es wird daraus geschlossen daß im Muskel keine direkte chemische Steuerung der Glykogenspaltung erfolgt. — Organpulver sollen fördernd wirken wegen des Gehaltes an Aminosäuren resp. Pepton (BADREAU 269)); Harnstoff fördert etwas die Glykogenspaltung im Muskelextrakt (BARBOUR, l. c. 206).

Komplicirtere organische Stoffe. Fluorescirende Farbstoffe sind nach CLAUS (l. c. 158) erheblich fördernd, auch in Wurzeln aus damit behandelten Samen, also im Dunklen; Eosin u.ä. können die Wirkung verdreifachen. — Hämatin u. a. schützen vor Schädigungen durch ph, Hitze, Sauerstoff (COSACK 270)), Hämoglobin hat keine Wirkung. BORCHARDT u. PRINGSHEIM (l. c. 304) konnten diese Versuche nicht reproduciren.

Alkaloide sind wieder mehrfach und ebenso ungenügend exakt untersucht worden (H.W. S. 702). PICCININI 271)—273) fand freie Basen der Morphingruppe und Chinagruppe bei sehr kleiner Konz. (Chinin 1 : 2000 — 500 000) etwas fördernd, während größere hemmen (Pankreasam., ohne Pufferung). Ähnlich verhalten sich Atropin, Emetin, Strychnin, Nicotin. — Auch FOSCHINI 274) findet unter ähnlich undurchsichtigen Versuchsbedingungen eine Förderung durch China-dekokt. — Coffein ist nach SABALITSCHKA (l. c. 257) ohne Wirkung. — Nicotin hemmt Taka bis 1:1000, darunter ohne Wirkung; Pyridin dementspr. bis 1 : 600 (275)) (wieder reine ph-Verschiebung). OHLSSON 276) hat alle diese Arbeiten mit Recht scharf kritisirt. Bei gemessenem ph hat auf Taka Chinidin garkeine Wirkung, ebenso bei Pankreas; alle anderen Chinabasen hemmen. Aktivirung tritt niemals auf; Grad der Hemmung für Taka und Pankreas etwas verschieden, Chinin stets am meisten.

Hormone, Vitamine. Die Prüfung solcher Stoffe hat meist zu dem Zwecke stattgefunden, aus Beeinflussungen der Amylase in vitro Schlüsse zu ziehen auf die Regulationen des Kohlenhydratstoffwechsels. Über den Wert resp. Unwert solcher Bemühungen haben wir uns schon öfters ausgesprochen; die Angaben seien also hier einfach registrirt; weitere bei den einzelnen Amylasen (§ 400 ff.).

PARTOS (l. c. 260) fand bei Leberamylase Insulin hemmend, Adrenalin, Hypophysenpräparat, Ovar fördernd. Adrenalin bis $< 10^{-6}$ auf Speichelam. fördernd (ROCKWOOD 277)). UTEWSKI 278) fand Insulin ohne Wirkung (Blut, Leber); ebenso DAVENPORT 278a) und EADIE (l. c. 206a) auch für Adrenalin; die angegebenen Wirkungen sind reine Salzwirkungen. Unwirksamkeit auf Am. aus Sarkom s. SCHARLES § 406.

Auf einem ganz anderen Niveau stehen die modernen Arbeiten über die Beeinflüssung durch Vitamine, soweit sie sich auf den Fermentprozeß als solchen erstrecken. Denn Vitamine haben z. T. chemisch ausdeutbare Wirkungen insofern, als sie selbst reversible Redoxsysteme darstellen, und dadurch ganz direkt in die enzymatische Katalyse eingreifen können, etwa durch Herstellung einer bestimmten Potential-lage. Diese Dinge werden uns hauptsächlich bei den Proteasen beschäftigen, für die

---

269) ***A. Badreau,*** Act. de qu. poudres d'organes sur l'amyl. Jl. de pharm. Chim., (8), **12**, 20 (1930). — 270) ***G. Cosack,*** Aktiv. etc. von Pankreasdiast. durch Hämatin. Bioch. Zs., **235**, 469 (1931). — 271) ***G. M. Piccinini,*** Infl. d. morfina etc. sopra l'amilol. Bioch. Ter. Sper., **11**, 439 (1924); BPh **30**, 653. — 272) ***Ders.,*** Alcaloide della china e amilolisi etc. Arch. intern. pharmacodyn., **32**, 225 (1926); BPh **39**, 871; Boll. Soc. Med. Modena, **27**, 61; BPh **44**, 472. — 273) ***Ders.,*** Anche l'atropina etc. poss. favorire l'amilol. Boll. Soc. Ital. Biol., **2**, 860 (1928); BPh **45**, 544. — 274) ***D. Foschini,*** L'az. del decotto di China sull' amilol. Boll. Sci. Med. Bologna, **3**, 235 (1925); BPh **34**, 95. — 275) ***G. Vascellari,*** Az. del fumo di tabacco etc. s. dig. diastas. Bioch. Ter. Sper., **13**, 469 (1926); BPh **40**, 315. — 276) ***E. Ohlsson,*** Act. des alcal. de Cinchona sur les enz. amylol. Arch. intern. pharm., **37**, 108 (1930). S.A. — 277) ***E. W. Rockwood, A. K. Keltch,*** Promotor act. of adrenalin on ptyalin. Jl. of Pharm., **27**, 256 (1926). — 278) ***A. Utewski, S. Epstein, W. Osinskaja,*** Einfl. von Insulin auf Amylase. Klin. Ws., **1933**, II, 388; BPh **73**, 169. — 278a) ***H. A. Davenport,*** Liver amylase etc. Jl. of biol. Chem., **70**, 625 (1926).

Amylasen liegt bisher wenig Material vor. Eine ältere Mitteilung von MIYAKE 279) über die Förderung durch Vitamin B ist freilich nur casuistisch zu werten. Dagegen bildet eine kurze Angabe von v. EULER c. s. 280) einen Teil der systematischen Untersuchung dieser neuen Vitaminprobleme; sie enthält nur die Tatsache, daß Am. (Weizen) von Ascorbinsäure gehemmt wird. PURR 281) bestätigt dies für β-Am. des Malzes; tierische Am. sollen sich gerade umgekehrt verhalten (Aktivirung der β, kein Einfluß auf Speichel, der reine α-Am. enthält). Dagegen hemmt die oxydirte Form der Ascorbinsäure pflanzliche α-Am., was PURR mit der Inaktivirung der α-Am. in den Samen zusammenbringt. Dann wäre also hier wirklich ein Zusammenhang mit dem Redoxpotential gegeben (vgl. § 394).

Fermente. Speichelam. wird durch Trypsin und Papain langsam zerstört. (282). ROTINI 283) sah dagegen bei Malzam. eine Aktivirung durch Papain, ferner sinkt die „kritische Energie".

§ 392. Eiweißstoffe, spezifische Aktivatoren und Paralysatoren. Was hier zu schildern ist, ist eine Anzahl von Befunden über angeblich spezifische Aktivatoren und Paralysatoren, die noch nicht zu entwirren sind. Einerseits handelt es sich um Phänomene, die ohne ersichtliche scharfe Grenze zu rein dispersoidchemischen und Adsorptionserscheinungen überleiten, andererseits um Angaben über bestimmte spezifische Einzelkörper, wie das PRINGSHEIM'sche Komplement und die Amylokinase von WALDSCHMIDT-LEITZ. Wir werden hier vorwiegend rein referirend vorgehen müssen (s. a. bei HESSE 284)).

Über die Wirkung der **Proteine an sich,** und zwar betont vom kolloidchemischen Standpunkt aus, liegen eine Reihe von Arbeiten von OPARIN, sowie der Schule v. PRZYLECKI vor, denen wir schon mehrfach begegnet sind. Es handelt sich in der Hauptsache um Sorption durch koagulirende und Desorption durch gelöste Proteine. Hier sei nur noch ergänzt, daß nach FILIPOWICZ (l. c. 255) Ovalbumin und Gelatine Malzamylase hemmen, wenn der ph < 4,5 liegt, aber bei > 4,5 steigend mit dem ph fördern; dies hängt damit zusammen, daß bei höherem ph keine Adsorption mehr eintritt (§ 384, l. c. 188).

Diese Wirkung der Proteine wird auch durch Elektrolyte beeinflußt, wie wir § 387 erwähnt haben (CHREMPINSKA, l. c. 238, BAUMGARTEN, l. c. 239); ebenso berichtet OPARIN, daß elektrolythaltige Eiweißlösungen das Enzym gegen Wärme empfindlicher machen, dialysirte schützen (l. c. 185). Auf die Hemmung durch Proteine bei saurer Reaktion (ph = 3,2) und Aufhebung bei alkalischer Reaktion scheinen auch die Verschiebungen der Wirksamkeit zwischen Zuckerbildung und Stärkeverflüssigung zu beziehen zu sein, die NISHIMURA 285, 285a) auf einen gegen Säure empfindlichen, durch Alkali regenerirten besonderen „Aktivator" zurückgeführt hat. Auch in Hefeauszügen fand er ein die Malzam. aktivirendes Prinzip, das gleichzeitig Amylopectin „verflüssigt".

Natürliche Hemmungskörper. Es liegen eine ganze Reihe von Angaben über natürliche Hemmungskörper vor, über deren Natur und Wirkung man sich kein Bild machen kann. OHLSSON 286) fand einen anscheinend proteinartigen Stoff im Malz, der durch Koagulation

279) ***M. Miyake,*** Infl. of the vitamin B on ... diastase. Orient. Jl. Dis. infants, **1,** 105 (1926); BPh **89,** 872. — 280) ***H. v. Euler, P. Karrer, F. Zehender,*** Verh. von Vit. C etc. gegen ... Enzyme. Helv. Chim. Acta, **17,** 157 (1934). — 281) ***A. Purr,*** Infl. of vit. C on ... amylases. Biochem. Jl., **28,** 1141 (1934). — 282) ***H. Tauber, I. S. Kleiner,*** Inact. of ... amylase by proteases. Jl. of biol. Chem., **105,** 411 (1934). S.A. — 283) ***O. T. Rotini,*** Az. attiv. etc. sull' amilasi. Ann. Labor. Spallanzani, **2,** 55 (1931). — 284) ***A. Hesse,*** Abbau von Stärke beim Mälzen etc. Erg. Enzymf., **3,** 95 (1934). — 285) ***S. Nishimura,*** Aktivator der Malzamylase. Bioch. Zs., **200,** 81 (1928). S.A. — 285a) ***Ders.,*** Das Stärke verflüss. Enzym. ebd., **228,** 161. (1930). S.A. — 286) ***E. Ohlsson,*** Die beiden Kompon. der Malzdiastase. Zs. phys. Chem., **189,** 17 (1930). S.A.

zerstört wird, er wirkt nur auf α-Am. Einen ebenfalls natürlichen mit der Am. vergesellschafteten Paralysator fanden DYCKERHOFF c. s. 287) im Pankreas. Dieser ist zu beseitigen, wenn man die Fermentlösungen mit festem Casein durchschüttelt oder einen Casein-Niederschlag in der Lösung erzeugt; das Casein nimmt den Hemmungskörper auf, und so kann die Wirkung bis auf das 6fache gesteigert werden. Einen Hemmungskörper gegen die „zuckerbildende" Komponente will HOLLANDER 288) in der Leber gefunden haben, der sich durch Zentrifugiren abtrennen läßt; nach einer Angabe bei v. PRZYLECKI (l. c. 170) hat sein Schuler WÓJCIK ebenfalls den filtrirten Auszug aus Leberpulver hemmend befunden.

Einen Hemmungsstoff fand weiterhin TINOZZI 289) in Tumoren und im Harn krebskranker Menschen. Wie üblich ist an gleicher Stelle auch ein „Aktivator" gefunden worden. FRÄNKEL c.s. 289a) geben an, daß Harn von Tumorträgern in 65 % der Fälle einen Aktivator der Harnam. enthält, anderer Menschen nur in 20 %, und dann meist im hohen Alter und bei Lues. Und endlich ergab sich bei der Diskussion darüber, ob Insulin in vitro die Leberamylase hemmt (§ 405), nach SMITH 290), daß Insulin an sich unwirksam ist, daß aber in Insulinpräparaten, besonders in Roh-Präparaten ein Hemmungskörper vorhanden ist.

Diesen mehr allgemeinen Befunden und Deutungen stellen nun CHRZASZCZ und JANICKI 291—296) ein System von mehr specifischen Hemmungskörpern und wieder gegen diese wirkenden „Befreiungs-Körpern" gegenüber, über die man schwer ein Urteil abgeben kann. Sie nennen sie **Sisto-amylasen** *) und **Eleuto-amylasen.**

Sie fanden diesen Paralysator zunächst in Keimlingen, nicht in ungekeimten Samen von *Fagopyrum*, dann in allen Getreidearten. Er ist unlöslich in Wasser und Alkohol, sehr thermolabil, ebenso wie Am. selbst. Das Blatt der Keimlinge wirkt 5 mal so stark wie die Wurzel. Die Wirkung beruht auf Adsorption oder Komplexbindung. Diese Wirkung wird nun durch Peptone aufgehoben, die deswegen eine besondere Substanz Eleuto-amylase (299) enthalten sollen. Peptone sind auf das Enzym an sich ohne Einfluß, sie heben nur diese Hemmung auf. In Buchweizen- und Gerstenmalz ist durch Sistoamylase $^1/_3$—$^1/_2$ des Gesamtenzyms gebunden, in anderen weniger. Daneben finden sich auch Eleutosubstanzen. Sisto-amylase-reiche Extrakte werden durch Schütteln inaktivirt, andere nicht, auch Verdünnen schwächt erheblich. Dann fand sich, daß auch tierische Am. durch die pflanzlichen Hemmungskörper inaktivirt werden; andererseits enthalten Speichel und Pankreas Sistoamylasen (293). Ebenso wie fertiges Pepton eluirend wirkt, wirkt der Abbau der adsorbirenden Proteine durch Papain; wenn man die Samen damit behandelt, tritt eine Freilegung der wirksamen Am. ein (vgl. §§ 376, 394). Auch Chymase wirkt ähnlich, aber etwas anders (295), II). Bei amylase-armen Samen (Hafer, Mais, *Fagopyrum*) tritt dies weniger hervor als bei Gerste etc. Die Wirkung erstreckt sich hauptsächlich auf die verzuckernde Kraft. Bei Hirse wirkt Papain, weniger Chymase, schwächend auf die Wirksamkeit der nachher gemachten Auszüge (294).

Mit der Amylokinase hat die Papainwirkung nichts zu tun, da Papain auf fertige Extrakte garnicht einwirkt; dagegen wirkt Trypsin dadurch, daß es eine Kinase enthält (s. u.) und zwar

*) Der Begriff „Sisto" als allgemeinen Ausdruck für „Hemmungskörper" ist von mir in Form des Ausdrucks Sistoproteasen eingeführt worden (H. W. S. 1084), was die Autoren nicht erwähnen, vielmehr ihrerseits als neu „vorschlagen".

287) ***H. Dyckerhoff, H. Miehler, V. Tadsen,*** Hemm. und Aktiv. der Pankreasenz. Bioch. Zs., **268**, 17 (1934). S.A. — 288) ***L. Hollander,*** Amyl. system of the liver. Science, **1934**, I, 17. — 289) ***F. P. Tinozzi,*** Diastase-Inaktivator in bösart. Geschw. Zs. Krebsf., **38**, 462 (1933); BPh **73**, 60. — 289a) ***E. Fränkel c. s.,*** Diastasegehalt und Aktiv. im Urin von Krebskranken etc. Bioch. Zs., **245**, 44 (1932). — 290) ***W. Smith,*** Act. of insulin on liver diast. Jl. of Phys., **62**, (Proc.) S. III (1926). — 291) ***T. Chrzaszcz, J. Janicki,*** Sisto-Amylase etc. Bioch. Zs., **260**, 354, **264**, 192, **265**, 260 (1933). — 292) ***Dies.,*** Eleuto-amylase etc. ebd., **263**, 250 (1933). — 293) ***Dies.,*** Inaktiv. of animal amyl. by plant paralysers etc. Biochem. Jl., **28**, 296 (1934). — 294) ***Dies.,*** Einfluß von Papain auf die amylol. Kraft etc. Bioch. Zs., **272**, 402 (1934). — 295) ***Dies.,*** Wirk. von Trypsin u. Amylokinase (Labferm.) auf die Menge der Amyl. verschied. Getreidearten. Bioch. Zs., **274**, 274 (1934), **278**, 112 (1935). — 296) ***Dies.,*** Pres. of a kinase of amyl. in trypsin prepar. Biochem. Jl., **28**, 1949 (1934); BPh **86**, 159.

vor Allem auf die dextrinirende Kraft; auch Chymase wirkt ähnlich. Da nun die Autoren dem ganzen Kreis von Erscheinungen eine grundsätzlich richtige Deutung geben, so ist es eigentlich schwer verständlich, warum sie trotzdem von besonderen Substanzen sprechen und ihnen besondere Namen geben. Es handelt sich einerseits um natürliche Bindung von Am. in den Samen, die nicht ganz so fest zu sein scheint, wie bei echten Desmo-enzymen, da sie eben noch durch Peptone partiell gelöst werden kann, die aber andererseits ebenso wie z. B. bei der Saccharase durch Aufschließung der Zellproteine mit Papain u. dgl. aufgehoben wird, so daß das Enzym frei wird. Die „Eleuto-amylase" ist also sicher nichts anderes als Pepton an sich, das hier ebenso desorbirend wirkt, wie u. U. auch lösliche Proteine; und die experimentelle Bindung bereits gelöster Am. an „Sisto-amylasen" ist nichts anderes als die bekannte Adsorption an ungelöste Proteine, die wir § 384 besprochen haben. In der Tat drückt sich auch OPARIN (l. c. 142) dahingehend aus, daß seine Versuche über inaktivirende Adsorption an Proteine und Reaktivirung durch gelöste Proteine oder Peptone gradezu Modelle für die Sisto- und Eleuto-amylasen darstellen.

Amylokinase. Irgendwie im Zusammenhang mit diesen allgemeineren Erscheinungen bei der Aktivirung der Amylase in keimenden Samen gegenüber den ruhenden Samen, die schon seit altersher bearbeitet worden sind (H.W. Bd. I, S. 706, und besonders Bd. IV, 1, SS. 34, 142; vgl. a. § 394) und den Anregungen von CHRZASZCZ stehen nun die Befunde von WALDSCHMIDT-LEITZ c. s. **297, 298)**, die aber doch auf einen Aktivator besonderer Art, von specifischen Charakter, deuten, auf eine wahre Kinase, um so mehr als sich die Wirkung dieser Amylokinase nur auf pflanzliche Am. erstreckt, und zwar auf α und β. Bei der Keimung erfolgt die Aktivirung bei β von selbst, da sich eben Amylokinase bildet; aber entgegen früheren Meinungen ist auch die α-Am. im ruhenden Samen vorgebildet, aber völlig inaktiv gegen Stärke und Dextrine. Amylokinase läßt sich durch elektive Adsorption von dem Enzym abtrennen und näher charakterisiren. Sie bleibt nämlich mit Tonerde C_γ bei 5,5 in Lösung, während beide Amylasen adsorbirt werden; weitere Reinigung durch Tonerde bei neutraler Reaktion und Elution mit Alkaliphosphat, dann Dialyse, Steigerung auf den 40fachen Wert.

Amylokinase ist nicht thermostabil und geht nicht durch tierische Membranen, ist also höher-molekular; wässerige Lösung beständig bei schwach saurer, wenig bei alkal. R. Hochgereinigte Präparate (Wert 1500) waren eiweißfrei, enthielten reichlich KH.

Als vorläufiges Maß für die Menge des Aktivators haben die Autoren die „**Amylokinaseeinheit** (Am.-K.[-e.])" definirt als diejenige Aktivatormenge, welche 0,01 Am.-E. (aus Pankreas) unter bestimmten Bedingungen eine Aktivirung entsprechend einer Maltosebildung von 10 mg in 20 Minuten erteilt.

Wie gesagt, wirkt die Amylokinase nur auf pflanzliche Am., eine zuerst beobachtete Wirkung auf Pankreasam. bei schwach saurem ph hat sich durch Dialyse oder nochmalige Tonerde-Adsorption bei neutraler R. abtrennen lassen; sie beruht einfach auf Calciumsalz, anscheinend Phosphat (§ 388), das bei schwach saurer, nicht bei optimaler Reaktion (6,8) fördert. Die davon befreite Amylokinase wirkt nicht mehr auf tierische Amylasen. Zusammenhang zwischen Menge des Aktivators und Umsatzsteigerung s. Abb. 53.

Der Auslegung dieses Aktivators als eines wahren Cofermentes steht HESSE **284)** skeptisch gegenüber; er denkt eher an indirekte Aktivirung durch Beseitigung von Hemmungskörpern, also in einer Kombination mit den Vorstellungen von CHRZASZCZ. LÜERS (l. c. 44, II) hat die

---

297) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Amylokinase etc. Zs. phys. Chem., **203**, 117 (1931), **213**, 63 (1932). S.A. — 298) ***E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel, A. Purr,*** α- und β-Amylase. Naturw., **1932**, 254.

Amylokinase in keimender Gerste nicht auffinden können; ebenso hat sie RAMACHANDRA RAU **299)** bei der Autolyse von Malzpulver vermißt, es wird nur β-Amyl. freigesetzt. Daß der im Pankreas gefundene auf Darmamylase wirksame thermolabile Aktivator von ARTOM (*l. c. 583a*) **300)** etwas mit der Amylokinase zu tun hat, ist nicht anzunehmen; Leber und Speichel enthalten ihn nicht (**301**). ARTOM diskutirt selbst die Wahrscheinlichkeit, daß es sich hier um Freilegung der an Protein gebundenen Darmamylase durch Trypsin handelt; auch CHRZASZCZ u. JANICKI **295/6)** fanden eine Kinase im käuflichen Trypsin, die vor allem die dextrinirende Wirkung des Malzes beeinflußt, vielleicht also auch die α-Amylase.

Abb. 53. Amylokinaseeinheiten und Umsatzsteigerung nach 294).

Einen thermostabilen Aktivator für die Glykogenverzuckerung fand GOTTSCHALK **302)** in der H e f e; über Beziehungen zum PRINGSHEIM'schen Komplement ist nichts ersichtlich, ebensowenig zu dem „Aktivator" von NISHIMURA (l. c. 285); über den thermostabilen „Diastase" aktivirenden Faktor in der Nebennierenrinde, den REINHARD **303)** gefunden haben will, ist nichts Näheres gesagt; über den im Harn von Krebskranken s. l. c. 289a.

Das Komplement. Wir haben bereits im H.W. S. 703 berichtet, daß PRINGSHEIM (*l. c. 351—353*) in Hefe, Malz etc. einen sonderbaren „Aktivator" gefunden hat, den er als Komplement der Amylase bezeichnete. Es wirkt nicht auf die Amylase an sich, sondern befähigt nur die Amylase, den „Restkörper" (§ 369) anzugreifen und in Maltose überzuführen. Was dies für ein Stoff ist, und wie er wirkt, ist heute noch unklar.

PRINGSHEIM fand das gereinigte Kompl. thermostabil; es entsteht bei der Pepsinspaltung von Proteinen (**304**). Auf Speichelam. wirkt energisch nur Kompl. aus Hefe (**305**). Noch stärker wirken nach BONDI **306)** tryptische Verdauungsgemische (Eialbumin, Casein), am besten wenn erst Pepsin, dann Trypsinkinase verdaut hat. Das sprach also für ein tief abgebautes Protein; tatsächlich fanden dann PRINGSHEIM u. BORCHARDT **307—309)** starke Aktivatorwirkung bei Glutathion und Cystein, auch oxydirtes Cystein wirkt. Reines S-S-Gl. ist am stärksten wirksam, Dithioglykolsäure unwirksam. Da auch KCN ähnlich wirkt, scheint es sich auch hier um Unschädlichmachung von Schwermetallspuren zu handeln, S-S-Gl. reaktivirt durch Cu vergiftete Pankreasam. (**304**). — SJÖBERG **310)** hat die ersten Angaben von PRINGSHEIM im wesentlichen bestätigt, ebenso LÜERS **311)**, der die mit Komplement aktivirte

299) ***R. H. Ramachandra Rau***, Zunahme der Amylasewirksamkeit währ. der Autolyse von Gerstenpulver. Proc. Ind. Acad., **1**, B, 686 (1935). Chem. Cbl., **1935**, II, 1192. — 300) ***C. Artom, L. Cioglia***, Dig. combin. dell'amido da parte delle amil. pancr. ed enter. Boll. Soc. Ital. Biol., **7**, H. 10, 1385 (1932). S.A. — 301) ***L. Cioglia***, Dig. comb. dell'amido da parte del secr. enter. etc. ebd., **8**, H. 4 (1933). S.A. — 302) ***A. Gottschalk***, Hefenamylase. Zs. phys. Chem., **178**, 139 (1928). — 303) ***A. Reinhard***, Einfl. der Nebennierenrinde auf bioch. Proz. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **204**, 760 (1924). — 304) ***H. Pringsheim, G. Otto***, (***M. Winter***), Kompl. der Amyl. Bioch. Zs., **173**, 399, 177, 406 (1926). S.A. — 305) ***H. Pringsheim, J. Bondi, E. Thilo***, Kompl. der Amyl. ebd., **197**, 143 (1928). S.A. — 306) ***J. Bondi***, Kompl. der Amyl. ebd., **203**, 88 (1928). — 307) ***H. Pringsheim, H. Borchardt, H. Hupfer***, Glutathion als Aktiv. der ferm. Stärkeverzuck. ebd., **238**, 476 (1931). S.A. Naturw., **1932**, 64. — 308) ***Dies.***, Zur Kenntnis der Stärke. Zs. V. D. Zuck., **81**, 633 (1931). S.A. — 309) ***H. Borchardt, H. Pringsheim***, Aktiv. von Pankr.-amyl. durch Glutathion. Bioch. Zs., **259**, 134 (1933). — 310) ***K. Sjöberg***, Das Pringsheimsche Kompl. der Amyl. Bioch. Zs., **159**, 468 (1925). — 311) ***H. Lüers, F. Wieninger***, Bestimm. der Stärke in der Gerste. Zs. ges. Brauw., **48**, 35 (1925).

Amylase zur quantit. Bestimmung der gesamten Stärke einschl. Amylopectin benutzen wollte. Auch Joszt 312) fand, daß Diastase + Hefe sonst resistente Dextrinanteile zu Ende spaltet.

Damit ist nun aber immer noch nicht geklärt, ob das Glutathion das „Komplement" ist, oder nur ebenso wirkt; und ferner, wie das Komplement wirkt. Die ganze Sache wird erheblich angezweifelt; so von Sullivan 313), dann von Weidenhagen 314), mit dem sich dann Pringsheim 308) auseinandergesetzt hat. Weidenhagen konnte überhaupt keine Aktivirung durch Hefe finden und führt die positiven Ergebnisse von Pringsheim c. s. auf die Wirkung beigemengter Maltase zurück; Pringsheim gibt aber an, daß seine Präparate maltasefrei waren. van Klinkenberg 315) konnte weder für Glutathion, noch für Hefen-autolysat, noch für verdautes Eiereiweiß die Komplementwirkung finden. Myrbäck 316) hingegen fand bei 20° keine Wirkung, wohl aber eine bei 40° für das Kompl. aus Hefe, manchmal auch für Glutathion. Wenn nicht, wie Myrbäck vermutet, die ganze Wirkung ein Schutz gegen thermische Inaktivirung oder Schwermetalle ist, wie er ja auch anderen Eiweißabbaustoffen zukommt, so ist dieser Effekt vorläufig ebenso wenig zu deuten, wie die ganze Angelegenheit des „Restkörpers" überhaupt. Vorläufig ist also die Frage der „Komplementwirkung" untrennbar verkoppelt mit den Geheimnissen des Stärkeabbaus. Es sei also nur wiederholt, daß nach den Befunden von Samec und Waldschmidt-Leitz 317) anscheinend überhaupt kein Raum für ein „Komplement" ist; Amylo-amylose wird durch Malz- und Pankreasam. völlig abgebaut; bei Erythro-amylose bleibt bei Pankreas die Hydrolyse bei etwa 70 % Verzuckerung stehen, und auch dieser Rest wird durch β-Am. total abgebaut, wobei nur in allen Fällen zwischen 40 und 50 % eine erhebliche Verlangsamung eintritt.

7) Hemmung durch die Spaltprodukte.

§ 393. Diese früher eifrig bearbeitete Frage hat neuerdings wenig Interesse gefunden, nachdem die Hemmung an sich nachgewiesen ist, und eine exakte kinetische Aufklärung bisher als hoffnungslos erscheinen muß, ehe man nicht mit einem Enzym an einem definirten Substrat arbeiten kann. Es ist also nur Weniges zu ergänzen.

Sjöberg c. s. 310) fanden wieder die Hemmung durch Maltose, auf Zuckerbildung stärker als auf die ersten Stadien; aber dieser Befund war an sich nicht ausreichend, um daraus auf 2 Enzyme zu schließen. Walker 319) fand Maltose hemmend, ebenso Glucose und Fructose, dagegen Saccharose und Lactose fördernd (Speichelam.). — Reid 320) fand auch Glucose hemmend (Blut, Malz). — Eine Hemmung der Glykogenspaltung durch Muskel-extrakt durch die entstehenden höheren Spaltprodukte, weniger durch Maltose, fand Carruthers 321).

Der einzige theoretisch wichtige Befund ist der von van Klinkenberg 322), daß β-Amylase stärker von β-Maltose, α-Am. von α-Maltose gehemmt wird. Aber auch seine Deutung läßt sich vorläufig noch nicht sicher in den enzymtypischen Verlauf des Abbaus einpassen, denn außer von v. Kl. selbst wird ja die β-Maltose allgemein als sekundäres Umwandlungsprodukt der eigentlichen Abbauformen angesehen.

---

312) ***A. Joszt, J. Trojan*** (Abbau von Dextrinen etc.) poln.; Res. dtsch. Przem. Chemiczny, **1927**, Nr. 4. S.A. — 313) ***B. Sullivan***, Complem. of amylase. Ann. de Brass. Dist., **24**, 49 (1925); Chem. Abstr., **20**, 1997 (1926). — 314) ***R. Weidenhagen, A. Wolf***, Z. Kenntn. der Stärke. Zs. V. D. Zuck., **80**, 866 (1930). — 315) ***G. A. van Klinkenberg***, Specif. der Amyl. Zs. phys. Chem., **212**, 173 (1932). — 316) ***K. Myrbäck, S. Myrbäck***, Grenzverzuck. der Stärke und das sog. Komplement. Svensk. Kem. Tidskr., **45**, 230 (1933). — 317) ***M. Samec, E. Waldschmidt-Leitz***, Enz. Spaltbark. der Amylo- und Erythrokörper etc. Zs. phys. Chem., **203**, 16 (1931). S.A. — 318) ***K. Sjöberg, E. Erikson***, Amylase. Zs. phys. Chem., **139**, 118, **142**, 215 (1924/5). — 319) ***H. Walker***, Infl. of diff. subst. on the diast. activ. of saliva. Biochem. Jl., **19**, 221 (1925). — 320) ***Ch. Reid***, Inhib. of starch hydrol. in the pres. of glucose. Jl. of Phys., **75**, (Proc.) 10 (1932). — 321) ***A. Carruthers, Wei Yung Lee***, Hydrol. of glycogen by glycerol extr. of muscle. Jl. of biol. Chem., **108**, **525**, 535 (1935); BPh. **88**, 348. — 322) ***G. A. van Klinkenberg***, Specif. der Amylasen. Zs. phys. Chem., **209**, 267 (1932). S.A.

Abgeschlossen: 10. 12. 35. Ber. Phys. 88. H. 7/8

D. Vorkommen und Bedeutung der Amylasen.

I. Phytoamylasen.

1) Amylasen der Samen.

§ 394. Es ließ sich nicht vermeiden, daß wir schon an mehreren Stellen vorgreifend auf die eigenartigen Verhältnisse der Amylasen in den Samen eingehen mußten, da diese von der Beschreibung der Enzyme als solche nicht zu trennen sind. Die Tatsache, daß die „Diastase" als Gesamtbegriff in den ruhenden Samen garnicht oder nur schwach wirksam ist, bei der Keimung aber sehr schnell zu starker Wirksamkeit anwächst, hat die Botaniker und — wegen der großen Wichtigkeit für die Mälzerei — auch die Gärungsfachleute seit jeher intensiv beschäftigt, wie bereits im H.W. S. 707 berichtet ist. Inzwischen sind diese Fragen von Hesse in Bd. IV, 1 des H.W., sowie in seinem kritischen Bericht **(1)** eingehend erörtert worden. Wir haben ferner auch in den vorangegangenen Abschnitten, so besonders bei den Lyo- und Desmo-amylasen (§ 376), den beiden Abarten der Am. (§ 379), bei der Adsorption der Am. (§ 384) und den Aktivatoren etc. (§ 392) einen wesentlichen Teil der Einzelheiten und der Literatur gegeben, so daß wir hier nicht Alles zu wiederholen brauchen und uns nach einer ganz kurzen Rekapitulation der Hauptsachen nur noch mit einigen specielleren Ergänzungen begnügen können.

Wir wollen davon absehen, daß selbstverständlich irgend wann einmal in den späteren Stadien der Keimung eine effektive Neubildung von Amylase in der jungen Pflanze auftritt; das ist ja kein isolirtes Problem, sondern gehört zu dem ganz generellen Problem der Mehrbildung in wachsenden Organismen und der Ersatz-bildung für verbrauchte Enzyme überhaupt, für das es ja bisher keine Lösung geben kann, solange wir nicht einmal die Vorstufen der wirksamen Fermente kennen. Andererseits aber kann, wie bereits im H.W. S. 707 ausgeführt, kein Zweifel daran bestehen, daß das plötzliche „Auftreten" von Am. bei den ersten Stadien der Keimung nicht oder in der Hauptsache nicht auf einer effektiven Neubildung des Enzyms beruht, sondern auf einer Aktivirung vorhandener, aber ruhender Amylasen. Der biologische Sinn dieser Versorgung des Samens mit nicht wirksamen Enzymen ist klar; es handelt sich um die Mitgabe einer latenten Energie seitens der Mutterpflanze, um dem zum eigenen Leben erwachenden Embryo sofort die Waffen in die Hand zu geben, um die Nahrungsmittelreserven des Samens aufzuschließen und zu verwerten. Weniger klar sind aber die chemischen Mechanismen. Zwar die Hauptsache ist zu erkennen: dieses „Ruhen" ist begründet in einer Bindung an Symplexe von Proteinen und Kohlenhydraten, die nicht nur zu Desmo-amylasen an sich führen, sondern auch — wohl durch eine besondere Abschirmung auch der wirksamen Gruppen — zur Unwirksamkeit. Diese Symplexe werden bei der Keimung zerstört und die Am. wirksam. Was hier die Proteasen der Samen selbst bewirken, kann man künstlich durch Papainverdauung nachahmen. Dies ist

1) ***A. Hesse,*** Abbau von Stärke etc. beim Mälzen und Maischen. Erg. Enzymf. III, 95 (1934).

bereits 1908 von FORD u. GUTHRIE (*l. c. 393*), genauer 1922 von BAKER u. HULTON (*l. c. 386*) festgestellt und seither vielfach bestätigt worden, besonders von WEICHHERZ c.s. **2**), MYRBÄCK **3**) und LÜERS **4**) (Näh. § 376).

Aber die Einzelheiten sind noch z. T. unklar. Zwar ist sicher, daß der Anteil der Am., der etwa aus ungekeimter Gerste in Lösung geht, ausschließlich β-Amylase ist (§ 376) und daß α-Amylase ebenfalls vorhanden, aber völlig inaktiv gebunden ist (WALDSCHMIDT-LEITZ **5**)); aber ob es sich bei der künstlichen Aktivirung als Modell der natürlichen Proteinasen-Wirkung mehr um Freilegung des Enzyms an sich (MYRBÄCK) oder um eine Freilegung des ebenfalls gebundenen Aktivators, der Amylokinase (§ 392) handelt; oder ob gar besondere „Freilegungssubstanzen", die „Eleuto-amylasen" erst künstlich gebildet werden, wie CHRZASZCZ **6, 7**) (§ 392) es will, das ist im Einzelnen noch nicht zu verfolgen.

Auch die Rolle der Amylokinase steht noch nicht klar im Bilde; ganz abgesehen von ihrer seltsamen Beschränkung nur auf pflanzliche Am., obgleich sie ebensowohl α wie β aktivirt, und die man zwar wohl allgemein als Befreiung der unwirksam an Symplexe gebundenen pflanzlichen gegenüber den tierischen Lyo-amylasen, aber noch nicht im Einzelnen deuten kann. Ihre Hauptfunktion ist jedenfalls die Aktivirung der α-Am., die vorher ganz unwirksam ist; sie aktivirt aber auch die β-Am., die bereits im ruhenden Korn etwas aktivirt ist, vielleicht deshalb, weil schon etwas Amylokinase vorhanden ist; aber dann ist wieder nicht ersichtlich, warum dann die α-Am. garnicht aktivirt wird. Denn im Gegensatz zur bei der Keimung anfangs langsam, dann sehr schnell an Wirksamkeit zunehmenden α-Am. (MYRBÄCK **3**)) nimmt die aktive β-Am. überhaupt nicht sehr stark zu und ist nach 4 Tagen schon fast völlig freigelegt und aktiv, so daß dann Papain so gut wie nichts mehr erreichen kann. Bei Weizen ist die β-Am. im ruhenden Korn besonders reichlich, nimmt in der Reihenfolge Weizen > Gerste > > Roggen > Hafer ab. (**8**). Die α-Am. tritt nach LÜERS **9**) am 3. Keimtage auf.

Gegenüber MYRBÄCK findet LÜERS **9**) doch auch während der Keimung ganz erhebliche Verstärkung durch Papain-aufschluß, sowohl für die gesamte Verzuckerung wie für die durch isolirte β-Am. (Abb. 54). Ob das nun eine „Freilegung" an sich voll aktivirten Enzyms aus einer Bindung ist,

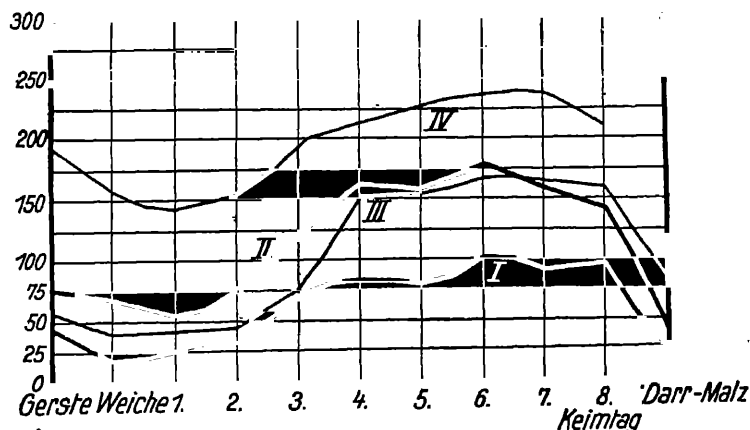



Abb. 54. I. Verzuckerungskraft der β-Amylase im normalen Auszug. II. do. im papayotinverdauten Auszug. III. Gesamtverzuckerung ohne Papain. IV. mit Papain. Nach LÜERS **9**).

2) ***I. Weichherz, R. Asmus,*** Vorg. bei der keim. Gerste. Bioch. Zs. **237**, 20 (1931). — 3) ***K. Myrbäck, S. Myrbäck,*** Gersten- und Malzamylase. ebd. **258**, 158 (1933). — 4) ***H. Lüers, R. Lechner,*** Einw. von Papain auf Gerste. Ws. Brau, **50**, 33, 297 (1933). — 5) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Amylokinase. Zs. phys. Chem. **203**, 117, **213**, 63 (1931/2). S.A. — 6) ***T. Chrzaszcz, J. Janicki,*** Eleuto-amylase etc. Bioch. Zs., **263**, 250 (1933), **272**, 402, **274**, 274 (1934). — 7) ***Dies.,*** Wirkliche und scheinbare Amylasenmenge in verschied. Getreidearten etc. Bioch. Zs., **265**, 260 (1933). — 8) ***T. Stenstam, C. O. Björling, E. Ohlsson,*** Amyl. in ruh. und keim. Samen. Zs. phys. Chem., **226**, 265 (1934). S.A. — 9) ***H. Lüers, W. Rümmler,*** Entwickl. der Amyl. während der Keimung. Ws. Brau, **50**, 297 (1933), **52**, 296 (1935). S.A.

oder Bildung eines besonderen „Aktivators", ist durchaus noch nicht klar. CHRZASZCZ will zwar nicht im Papain, wohl aber im käuflichen Trypsin einen solchen Aktivator gefunden haben, dessen Beziehungen ebensowohl nur einfachen „Eleuto"-Wirkung der Peptone (s. u.) wie zur Amylokinase unklar sind. Diese Amylokinase haben nun sowohl WEIDENHAGEN wie LÜERS überhaupt nicht finden können. LÜERS findet am 3. Keimtag ein plötzliches Anwachsen der Papain-auszüge an β-Am. gegenüber den normalen, welches die ursprüngliche starke Schädigung grade der Papainauszüge bei der absichtlichen Vernichtung der α-Am. mehr als wettmacht. Hier tritt also jedenfalls nicht blos eine „Vermehrung", sondern eine Aktivirung der β-Am. auf (Abb. 55). LÜERS wirft mit Recht die Frage auf, ob es nicht viel einfacher wäre, alle diese sonderbaren Erscheinungen durch die Wirkung von Aminosäuren oder Peptiden zu erklären, die durch die Proteinasen der Samen (vom 3. Keimtag an) reichlich entstehen. Denn daß Peptone u. dgl. „aktiviren", ist ja längst bekannt. Schon FORD und GUTHRIE (*l. c. 393*) haben mit gekochtem Papain, Pepton etc. Amylase aus dem ruhenden Korn herausholen können, ebenso wie später CHRZASZCZ **6) 7)**, der diese Wirkungen speciell bei Peptonen, resp. seiner Eleuto-amylase je nach der Art der Samen ganz verschieden fand, auch für die verschiedenen Amylasen verschieden, ebenso wie die Mengen an „Sistoamylasen" verschieden sind (§ 392). Daneben laufen noch ganz einfache Wirkungen wohl nur desorbirender Art; so haben FORD und GUTHRIE allerlei Salzlösungen wirksam befunden. Auch JÓZSA u. GORE **10)** haben mit 0,8%iger NaCl-Lösung und durch Zucker eine Extraktion beider Am. in wirksamem Zustande aus Weizenmehl etc. erzielt. Es gehen also wohl auch bei der Keimung allerlei specifische und unspecifische Lockerungsvorgänge nebeneinander her: weitere Einzelheiten bei HESSE (l. c. 1).

Abb. 55.
Änderung der Wirkung der β-Am. in Prozenten der ursprünglich vorhandenen gesamten verzuckernden Wirkung nach Ausschaltung der α-Am. A. normaler Auszug. B. Papain. Nach LÜERS 9).

Daß auch reine Permeabilitätsfragen mitwirken, zeigen die Befunde von NORD **11) 12)** der z. B. mit Aethylen als oberflächenaktivem Stoff eine sehr schnelle Entwicklung der diastatischen Kraft und Abkürzung der Keimdauer erzielen konnte; Acetylen wirkt noch stärker. Weiterhin liegen Möglichkeiten vor, daß der Aktivirungsgrad mit der Oxydationslage, dh. den Redoxpotentialen in den Samen zusammenhängt. PURR **12a)** hat für Samenamylase gefunden, daß Vitamin C (Ascorbinsäure) β-Am. hemmt, α nicht; wohl aber wird α von der oxydirten Form der Ascorbinsäure gehemmt (vgl. § 391). Nun hat VIRTANEN angegeben, daß beim Reifen der Samen das aktive Vitamin C verschwindet. PURR nimmt also an, daß dieses Verschwinden auf der Ausbildung der oxydirten Form beruht und dadurch die Inaktivirung der α-Am. herbeigeführt wird.

Über die Vorgänge bei der Sekretion der Am. der Samen machen HORNING c. s. **13)**

10) ***S. Józsa, H. Gore,*** Developm. of diast. enz. of malt. etc. Ind. and Eng. Chem., **24,** 95 (1932). — 11) ***F. F. Nord, I. Weichherz,*** Enzym. Vorg. in der keim. Gerste. Zs. phys. Chem., **188,** 218 (1929); DRP **6a,** 508560. — 12) ***F. F. Nord,*** Physikal.-chem. Vorg. bei Enzymreakt. Erg. Enzymf. I, 77, (98) (1932). — 12a) ***A. Purr,*** Infl. of Vitamin C on amyl. Bioch. Jl. **28,** 1141 (1934). — 13) ***E. S. Horning, A. H. K. Petrie,*** Enz. funct. of mitochondria in the germin. of cereals. Proc. Roy. Soc., **B 102,** 188 (1927); — ***E. S. Horning,*** Enz. funct. of mitochondria. Erg. Enzymf. II, 336 (1933).

interessante Angaben, die auf die Beteiligung der **Mitochondrien** bei diesem Prozeß hinweisen, denen man ja grundsätzlich die Rolle zuschreibt, durch bestimmte Auswahl aus dem Cytoplasma bestimmte Zellstoffe aufzubauen; diese Vorgänge finden an der Grenzfläche statt. Daß die Sekretion hauptsächlich im Scutellum stattfindet, ist bereits im H.W. S. 708 (*l. c. 391*) mitgeteilt. Während der Keimung nehmen nun hier die Mitochondrien an Menge zu und werden in die umgebenden stärkehaltigen Zellen abgeschieden; ihre Zahl steht mit dem Grad der Stärkehydrolyse in Verbindung. Im isolirten Endosperm finden sich nur wenige Mitochondrien, und demgemäß ist die Stärkehydrolyse gering. Die Mitochondrien sind Lipoid-Eiweiß-Symplexe, welche die Plasmahaut durchdringen können und anscheinend ganz unmittelbar die Träger der Enzymproduktion sind.

Bei *Pisum sativum* sah MAIGE 14/5) bei der Keimung eine Auflösung der Stärkekörner in den Samenlappen durch eine Am. aus dem Cytoplasma. Nach seiner Ansicht entsteht die Am. überhaupt im Cytoplasma außerhalb der Plastiden, nicht in deren Stroma.

Verschiedene Weizensorten hat neuerdings wieder SWANSON 17) auf ihren Gehalt an Am. geprüft. Durum enthielt mehr als Sommerweizen; Weichwinter < Hardwinter. Auf eine eingehende mehr technischen Zwecken dienende Untersuchung der Am. in Weizenmehlen von BERLINER c. s. 18) kann nur verwiesen werden. Bei Mais enthalten die „wachsigen" Abarten (die eine Erythro-amylose enthalten) nach BRINK 19) weniger Am. als die gewöhnlichen; der Pollen verhält sich umgekehrt.

Vorherige Erhitzung keimender Samen (Mais, Hafer, *Tropaeolum, Nicotiana*) bewirkt eine vorübergehende Verminderung der amylatischen Wirksamkeit, dagegen bei den Würzelchen eine Erhöhung auf das 4—8fache. Geotropische Reizung hat keine Wirkung (KERN 16)).

Sonstige Angaben über Amylasen in Samen. Zu den bereits bei der Darstellung der Amylasen (§ 375) und dem Vorkommen der beiden Abarten (§ 379) gemachten Angaben, so von indischen Autoren bei *Sorghum* und *Eleusine coracana* etc. sei hier noch ergänzt:

Bei *Vicia faba* ist nach BLAGOWESTSCHENSKI 20) der Amylasegehalt des reifenden Samens symbat mit der Stärkemenge; er schließt daraus auf eine synthetische Stärkebildung durch das Enzym. GHATAK 21) fand Am. in den Samen von *Caesalpinia bonducella*; über Am. aus „*Cumbu*" (*Pennisetum typhoideum*) s. 22). ph-Opt. = 5,1 bei kurzen Versuchen; bei über 30′ zwei Opt. (4,6 und 6,2). Beziehungen zwischen P-Gehalt des Bodens und Amyl. bei Sojabohnen ENGLIS 23); deutliche Abhängigkeit nicht ersichtlich; kleine Mengen scheinen etwas die Amylasemenge zu erhöhen, große hemmen jedenfalls. Auch K ist ohne wesentliche Bedeutung (26)).

Im „Emulsin" der Mandeln fand JOSEPHSON 24) Am., und zwar im Verhältnis 1 : 200 der β-Glucosidase.

2) Amylasen anderer Pflanzenteile.

§ 398. Da nun einmal bekannt ist, daß Amylase überall vorkommt, hat das bloße Aufsuchen in Pflanzenteilen kein Interesse mehr. Die Untersuchung hat vielmehr die nähere Erkenntnis der Enzyme selbst zum Ziele, wie etwa abweichende ph-Optima, verschiedene Verteilung der beiden Typen etc. Diesen Arbeiten sind wir bereits begegnet, so denen von GIRI über die Am. der süßen Kartoffel (*Ipomoea batatas*)

14) ***A. Maige,*** Digest. de l'amidon dans les cell. cotylédonn. etc. Soc. Biol., **94,** 697 (1926). — 15) ***A. Maige,*** Origine de l'amyl. dans les cell. végétales. C. R., **184,** 1130 (1927). — 16) ***H. Kern,*** Diastat. Wirksamkeit in der Pflanze etc. Zs. Bot., **21,** 193 (1928); BPh **49,** 192. — 17) ***C. O. Swanson,*** Diastat. activ. in wheat. Cereal chem., **12,** 89 (1935). — 18) ***E. Berliner, R. Rüter,*** Diastasestud. an Weizenmehlen. Zs. ges. Mühlenwesen, **5,** 134, 156, **7,** 63 (1930). — 19) ***R. A. Brink,*** Enz. diff. assoc. with the waxy gene in maize. Genetics, **14,** 569 (1929); BPh **55,** 326. — 20) ***A. Blagowestschenski,*** Unters. über Samenreifung. Bioch. Zs., **157,** 201 (1925). — 21) ***N. Ghatak,*** Samen von Caesalpinia bonducella. Proc. Acad. Sci. U. P. India, **4,** 141 (1934); Chem. Cbl. 1935, II, 52. — 22) ***D. Narayanamurti, R. V. Norris c.s.,*** Stud. on enz. act. III. Jl. Ind. Inst. Sci., **A 12,** 105 (1929). — 23) ***D. T. Englis, L. Gerber,*** Diast. activ. in plants. Soil Sci., **28,** 221 (1929). — 24) ***K. Josephson,*** Enz. des Emulsins. Ber. Chem. Ges., **58,** 2726 (1925).

u. a. Oder es handelt sich um mehr praktische Zwecke der Nahrungsmittelchemiker; es liegen überhaupt nur wenige solcher Angaben vor; es ist aber auch sehr wahrscheinlich, daß mir viele solche vereinzelten Angaben entgangen sind.

Als Kennzeichen verschiedener Sorten läßt sich der Gehalt an Am. nach Rubin **25)** nicht verwenden (Rettich, Radieschen, Kohlarten), da die Unterschiede nicht wesentlich sind. Bei ganzen Pflanzen (*Nasturtium*) kein ersichtlicher Zusammenhang der Aktivität mit der Zufuhr von K zum Boden (Englis **26)**), entscheidend sind überhaupt günstige Wachstumsbedingungen.

Knollen. v. Doby **27)** hat seine Untersuchungen (*l. c. 413*) über die Am. der Kartoffeln fortgesetzt; ph-Opt. der β-Am. = 6,95—7,0, Salze aktiviren; auch NaF bei 0,001—0,1 n. Steigerung während der Ruheperiode in 2 Monaten auf den fünffachen Wert, z. T. durch natürliche Abnahme der sauren Reaktion, z. T. durch effektive Neubildung. Zunahme bei Autolyse des Breies. Joszt **27a)** fand Unterschiede im Gehalt während der Keimung an 51 Varietäten; unabhängig vom Stärkegehalt, Keimungsgrad und ph.

Früchte. Bei Bananen enthält nach Sastri **28)** die Schale mehr als das Innere; aber die ganze Frucht mehr als beide einzeln untersucht. Sastri vermutet Aktivatoren, die nicht gleichmäßig verteilt sind.

Blätter. Die bereits im H.W. (Weber, *l. c. 420*) berichtete Bedeutung der Aktivirung und Passivirung der Am. für die Tätigkeit der Schließzellen ist von Weber **29)** ausführlicher behandelt und bestätigt worden.

In den Blättern kalihungriger Zuckerrüben mehr Am. als bei voll ernährten; es nimmt beim Altern der Pflanze die Am. wesentlich langsamer ab als bei voll ernährten Pflanzen (v. Doby **30)**). Bei voll ernährten Verschwinden der Aktivirbarkeit durch Ionen. Genauere Untersuchung der Am. der Zuckerrübenblätter v. Doby **31)**: opt. ph der β-Am. 6,0. Temp.-Opt. 42° im Blatt selbst, im Dauerpräparat 58°. Arrhenius-Konstante niedriger als bei anderen Pflanzenam. Tötungstemp. nach v. Euler nur wenig höher als Opt. Keine Regeneration der hitzeinaktivirten Am. — Diese Blattam. ist ebenfalls z. T. inaktiv gebunden wie die der Samen (§ 376) (Oparin **32)**; sie steht im Blatt selbst im Gleichgewicht mit gelöster Am. je nach den Milieubedingungen. Wasser löst sie allmählich ab, Puffer bei ph = 8 vollständig. — Bei Kartoffelblättern β-Am. am meisten bei Hunger, nimmt mit dem Alter bei jedem Ernährungszustand ab (Doby **33)**); Hartt **34)** fand bei *Saccharum officinarum* keine sichere Beziehung zwischen K-Mangel und Am.

Im Saft von *Ficus carica* fand eine Am. Orrù **35)**. ph-Opt. bei 5,3 und weniger ausgesprochen bei 6,4—6,6.

3) Amylase der Kryptogamen.

§ **399.** Die Amylase der Hefen, deren Vorhandensein man aus der Spaltung des zelleigenen Glykogens (H.W. S. 713) erschließen konnte, und die Harden (*l. c. 432*) auch schon in geringer Menge freilegen konnte, ist von Gottschalk **36)** näher untersucht

25) ***B. Rubin, L. Naumova,*** Aktiv. der Enz. als Kennz. der Sorte. C. R. Ac. USSR, **4,** 486 (1934); BPh **87,** 74. — 26) ***D. T. Englis, H. A. Lunt,*** Diast. activ. of Nasturtium. Soil Sci., **20,** 459 (1925). — 27) ***G. v. Doby, J. Burger,*** Kartoffelamylase. Ferm.-Forsch., **13,** 201 (1932). — 27a) ***A. Joszt c.s.,*** Pouv. amylol. des .... pommes de terre. Rozpraw bjolog. z zakresu roln. etc. (poln., Rés. franz.), Lwow 1922. S.A. — 28) ***B. N. Sastri, G. R. Row,*** On banana amyl. Proc. Ind. Acad., B **1,** 318 (1934); BPh **87,** 302. — 29) ***F. Weber,*** Die Schließzellen. Arch. exp. Zellforsch., **3,** 101 (1926); BPh **38,** 804. — 30) ***G. v. Doby, R. P. Hibbard,*** Amyl. Kalihungr. Zuckerrüben. Bioch. Zs., **176,** 165 (1926). — 31) ***G. v. Doby, L. v. Brázay,*** Amyl. der Zuckerrübenblätter. Fermentforsch., **13,** 212 (1932). — 32) ***A. Oparin, S. Risskina,*** Aktiv. der Amyl. in den Blätt. der Zuckerrübe. Bioch. Zs., **252,** 8 (1932). — 33) ***G. v. Doby, E. Szladits,*** Saccharogenamyl. der Blätter versch. ernährter Kartoff. Zs. phys. Chem., **206,** 177 (1932). — 34) ***C. E. Hartt,*** Potass. defic. in sugar cane (Amylase). Bot. Gazette **88,** 229 (1929). — 35) ***A. Orrù,*** Az. del latice del Ficus carica sull'amido. Boll. Soc. Ital. Biol. **5,** 176 (1930); BPh **57,** 569. — 36) ***A. Gottschalk,*** Hefe-amylase etc. Zs. phys. Chem., **158,** 215 (1926), **178,** 189 (1928).

worden. Glykogen wird von Macerationssäften aus Trocken-Unterhefe glatt vergoren, nach dem Auswaschen der Cozymase tritt nur noch hydrolytischer Abbau zu Glucose ein. Aceton-unterhefe gibt nur geringe Mengen an das Waschwasser ab, der Rückstand baut auch zugesetztes Gl. ab. Die Am. scheint nur zurückgehalten, nicht Desmo-am. zu sein.

Hefe enthält auch einen thermostabilen Aktivator (§ 392). NISHIMURA **37)** fand in autolysirter Toluol-hefe und Trockenhefe ein „besonderes" Enzym, das Amylopectin und Glykogen angreift und „verflüssigt". Reinigung mit Adsorption an Eisenoxydsol, Elution bei ph = 8, auf das siebenfache. Das Enzym wirkt auch als „Synthease" (§ 380).

Nachweis von Amylase auf festen Stärke-nährböden (DÜLL **38)**) bei *Saccharomyces* (*cerevisiae, lactis*), *Eutorula rubra, Mycotorula sp.* (ph = 4,9). Erhöht bei Abwesenheit von Zucker, bei Zusatz von Pepton oder Asparagin.

Schimmelpilze. Von diesen ist das bei weitem wichtigste Objekt *Aspergillus oryzae*, dessen Taka-amylase vielfach untersucht ist, wie uns in allen Abschnitten begegnet ist. Hier sei nur nochmals die grundlegende Arbeit von OHLSSON c. s. **39)** angeführt; weitere Untersuchung der Am. neben anderen Taka-fermenten s. NISHIMURA **40)** und NISHIKAWA **41)**. Auf eine sehr umfangreiche mehr technische Untersuchung des Gesamtpräparates *Koji* (H.W. S. 713) von ITO **42)** kann nur verwiesen werden.

Über die Beeinflussung der Enzymbildung durch die äußeren Lebensumstände gibt FUNKE **43)** an, daß die C-Quelle ziemlich gleichgiltig ist, dagegen die Acidität eine ausschlaggebende Rolle spielt. Nur auf gepufferten Nährböden (ca. ph = 6) tritt eine starke Enzymbildung ein, bei natürlicher Acidität garkeine (ph = 4). KNAPP **44)** fand bei *Asp. oryzae* und *flavus* Abhängigkeit von gutem Nährboden, schnellem Wachstum und opt. Temperatur.

Bei anderen Aspergilleen (*Asp. effusus* und *parasiticus*) fand KNAPP **44)** nur eine schwache (*A. flavus*) oder garkeine Amylase; FUNKE **45)** aber auch bei *Asp. niger*, stark abhängig von der Natur der Zucker. Fructose, Mannose, Lactose sollen die Bildung verhindern (?). — Eine Anpassung der Enzymwirkung an die Züchtungstemp. liegt nicht vor (LUIPPOLD **46)**).

Bei **Algen** (Florideen: *Lemanea, Sacheria*) findet sich Glykogen (COLIN **47)**), somit wohl auch Amylase; der direkte Nachweis ist hier noch nicht geglückt, wohl aber bei anderen Rotalgen (*l. c. 466*); über Am. bei grünen Algen s. SJÖBERG (*l. c. 465*).

Bakterien. DÜLL **38)** fand auf festen Nährböden wie bei Hefen Am. bei vielen, insbesondere Milchsäure bildenden Bakterien, so Streptococen und *Streptobacterium, Microbacterium* etc.

In einem technischen Diastase-präparat aus Bakterien *Superclastase* fand LÜERS **48)** ein Enzym, das Kartoffelstärke sehr energisch „verflüssigt" (Viscositätsabnahme um 90 %), ohne daß Maltose auftritt. (Reine Amylophosphatase?)

II. Zooamylasen.

§ 400. Ob die so augenfälligen äußeren Verschiedenheiten der tierischen Amylasen in bezug auf den opt. ph, die Aktivirung durch Elektrolyte etc. ihre Ursache in wirk-

37) ***S. Nishimura,*** Stärke verflüss. Enzym in Trockenhefenautol. Bioch. Zs. **228**, 161 (1930). S.A. — 38) ***A. Düll,*** Diastase bild. Bakt. und Hefen. Zbl. Bakt. (II), **88**, 81 (1933). — 39) ***E. Ohlsson, T. Swaetichin,*** (***O. Edfeldt***), Takadiast. Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 333, **15**, 430 (1929/33). S.A. — 40) ***S. Nishimura,*** Takadiastase. Chemie der Zelle, **12**, 202 (1925). — 41) ***K. Nishikawa,*** Takadiastase. Bioch. Zs., **188**, 386 (1927). — 42) ***M. Ito,*** Nature of Koji-diastase. Jl. Fac. of Agr. Sapporo, **30**, 243 (1932); BPh **71**, 434. — 43) ***G.L.Funke,*** Form. of diast. by Asp. oryzae. Rec. trav. bot. Néerl., **24**, 583 (1927); BPh **43**, 471. — 44) ***H. Knapp,*** Amylasebild. bei ein. Aspergillusarten. Zbl. Bakt. (II), **71**, 372 (1927). — 45) ***G. L. Funke,*** Form. of diast. by Asp. niger. Rec. trav. bot. Néerl., **23**, 200 (1926); BPh **39**, 736. — 46) ***El. Luippold,*** Einfl. der Kulturtemp. etc. auf . . . Diast. von Asp. niger. Jb. wiss. Bot., **70**, 26 (1929); BPh **52**, 487. — 47) ***H. Colin, J. Augier,*** Floridoside . . . et glycogène chez les algues rouges etc. C. R., **197**, 423 (1933). — 48) ***H. Lüers, A. Löther,*** Viscosim. Verfolg. von Enzymreakt. Ws. Brau, **52**, 49 (1935). S.A.

.lichen Differenzen im eigentlichen Enzym-system haben, ist auch heute noch nicht zu sagen. Bisher ist es wahrscheinlicher, daß sie im weiteren System liegen, denn die Tendenz geht mehr dahin, die bekannten Unterschiede allmählich wegzuräumen, als neue und wesentliche aufzufinden. Einerseits hat man eiweißfreie Phytoamylasen hergestellt, andererseits ist besonders das Auffinden der Desmo-amylasen (§ 376) geeignet, die Kluft zu überbrücken. Sehr auffallend ist allerdings die Angabe von Waldschmidt-Leitz, daß seine Amylokinase (§ 392) ganz ausschließlich auf Phytoamylasen wirken soll; jedoch ist Alles um diese Aktivatoren herum noch recht undurchsichtig. Wir können also die Frage nicht beantworten. Sonst ist generell nur noch zu sagen, daß alle tierischen Am. betont, aber nicht ausschließlich α-Amylasen sind.

1) Speichelamylase.

Die Frage, welche Tiere überhaupt Am. im Mundspeichel führen, ist sonderbarerweise immer noch nicht einhellig beantwortet. Anscheinend ist es nicht möglich, die Rolle der im Speichel vorhandenen zelligen Elemente, vor Allem der Leucocyten richtig einzuschätzen. Daß Mensch und wesentlich schwächer Schwein Am. enthalten, steht ja nun fest, aber z. B. fand Jung **49)** wieder als einziges sonst Am. führendes Säugetier das Kaninchen. Schwarz c. s. **50, 51)** fanden aber hier keine Am. (oder Spuren), ebensowenig bei Schaf, Rind, Ziege, Pferd, Hund; sicherer Nachweis bei *Cavia*, Ratte, Maus. Lucking **52)** fand nur bei Omnivoren Am., bei Herbivoren nicht (Glykogen, Nephelometrie).

Aus einfachen Fütterungsversuchen zieht Roseboom **53)** den sicherlich nicht zutreffenden Schluß, daß Hunde Speichelam. haben; die Nicht-existenz von Am. im Speichel der Carnivoren ist als gesichert anzunehmen. Wenn man gelegentlich sehr geringe Mengen findet, wie wieder Jung **54)**, Galehr **55)**, Gayda **56)**, so sind sie jedenfalls kein wahres Sekretionsprodukt; neben Zellelementen kommt auch Durchtritt aus dem Blut in Betracht (Gayda **56)**.

Injicirter menschlicher Speichel resp. Pankreassaft rufen aber beim Hund nur eine geringe Erhöhung der an sich minimalen Speichelamylase hervor, die Drüse nimmt also kein Enzym aus der Blutbahn auf (Tomasino **57)**.

Wieder im Gegensatz zu fast allen Voruntersuchern fand Chrzaszcz **58)** Am. beim Rind und noch reichlicher beim Pferd, am meisten nach der Fütterung, vermindert nur bei schweren Erkrankungen. Wassmann **59)** hat Am. beim Pferd wieder nicht gefunden, freilich nur mit Jodreaktion geprüft; ebenso fehlt sie bei der Ziege (Parotis, Albrecht **60)**, Mandibularis, Warnecke **61)**).

Beim Kaninchen fand wie Jung und im Gegensatz zu Schwarz reichlich Am. Gayda **62)**

---

49) ***L. Jung***, Rôle de la salive etc. Soc. Biol., **93**, 526 (1925); BPh **33**, 261. — 50) ***C. Schwarz***, ***K. Steinmetzer***, Diast. Kraft des ... Mundspeich. von Mensch etc. Fermentforsch., **7**, 228, 247 (1923). — 51) ***C. Schwarz***, ***F. Rasp***, Diastat. Kraft des gemischten Mundspeichels etc. Fermentforsch., **9**, 50 (1927). — 52) ***W. Lücking***, Speicheldiast. des Menschen und versch. Haustiere. D. tierärztl. Ws., **1926**, 257. — 53) ***B. B. Roseboom***, ***J. W. Pattori***, Starch dig. in the dog. Jl. Am. Veter. Med. Ass., **74**, 768 (1929); BPh **50**, 764. — 54) ***L. Jung***, Act. amylol. de la salive du chien. Soc. Biol., **91**, 673 (1924); BPh **29**, 588. — 55) ***O. Galehr***, Amylasegeh. des Hundespeichels. Fermentforsch., **9**, 224 (1927). — 56) ***T. Gayda***, Pot. amilolit. d. saliva del cane. Arch. di Sci. Biol., **7**, 438 (1925). S.A. — 57) ***A. Tomasino***, Amil. saliv. del cane etc. Boll. Soc. Ital. Biol., **2**, 341 (1927); BPh **42**, 522. — 58) ***T. Chrzaszcz***, ***Z. Schechtlówna***, Amyl. des Speichels der Rinder u. Pferde. Bioch. Zs., **219**, 30 (1930). — 59) ***O. Wassmann***, Sekr. der Gland. mandibul. des Pferdes. Diss. Hannover 1934. S.A. — 60) ***H. Albrecht***, Sekr. der Parotis ... Ziegen. Diss. Hannover 1931. S.A. — 61) ***K. Warnecke***, Sekr. der Gl. mandib. der Ziege. Diss. Hannover 1930. S.A. — 62) ***T. Gayda***, Infl. del digiuno sul pot. amilol. d. saliva. Arch. di Fis., **24**, 692 (1926). S.A.

und als Sekret fast nur der Parotis FISCHL 63). GAYDA fand Abnahme im Hunger bis auf ganz geringe Werte, bei Aufnahme der Fütterung zur Norm zurückkehrend. Die Abnahme hat direkt mit einer Störung der Drüsenfunktion zu tun, nicht mit dem KH-Stoffwechsel. FISCHL fand Am. im Hunger anfangs steigend, dann fallend; dauerndes Absinken auf sehr geringe Werte (GAYDA) nicht bestätigt.

Das Sekret der Drüsen des Planum nasolabiale (Rind) enthält keine Am. (SCHWARZ 64)

Bei Amphibien (*Rana, Bufo vulgaris*) vorhanden, bei Kaulquappen von *Pelobates fuscus* noch nicht (JUNOLD 65)).

Zur **Sekretion** der Amylase liegen kaum wesentliche Befunde vor, außer einer Arbeit von LESSER 66) an der Parotis der Maus. Die Am. ist z. T. an die Strukturbestandteile der Zelle adsorbirt und wird bei der Sekretion erst allmählich frei; in 100′ gehen aus der überlebenden Drüse erst 15 % Amylase heraus, der Austritt wird immer langsamer. Diese Bindung ist durch Behandeln mit Propylalkohol zu lösen, die Am. wird frei diffusibel; es handelt sich also nicht um echte Desmo-amylase, sondern nur um eine lockere Adsorption.

Pilocarpin beschleunigt den Austritt aus der überlebenden Drüse. ZAGAMI 67) hat am Hunde den Parotis-speichel nach Säurereiz geprüft. Die Amyl. steigt in 15′ schnell an und sinkt dann gleichmäßig langsam ab, ist aber noch nach 2 h vermehrt. Beim Schwein haben TRAUTMANN 68) und sein Schüler BODE 69) die Sekretion der Parotis an Fisteln untersucht. Sie erfolgt schußweise; von Reizen sind die mechanischen wirksamer als die chemischen; am stärksten wirkt Rauhfutter (Hafer), Höhepunkt 5—10 Min. nach der Fütterung. Diastase etwas abhängig vom KH-Gehalt der Nährung. Pilocarpin wirkt wenig. Psychische Sekretion vorhanden. Die anderen Speicheldrüsen (Sublingualis, Mandibularis) liefern keine Amylase (HENCKE 70)). Ganz ähnlich die Befunde am Pferd (WASSMANN 59)).

Untersuchungen beim Menschen. Bei Frühgeburten vorhanden (COCCHI 71)) etwa $^1/_{10}$ an Menge wie bei Erwachsenen (MAYER 72)), bei Neugeborenen kaum mehr; stark schwankend, keine Abhängigkeit von der Ernährung (HENSEL 73)); bei allen **Kindern** Zunahme nach der Mahlzeit, wenn gesundes Wachstum; Abnahme bei Störungen (COCCHI 71)). Diese Zunahme nach der Mahlzeit fand auch fast stets bei **Erwachsenen** SOLMS 74). — Nach SCHWARZ (l. c. 50) ist der ungefähre Mittelwert D (nach BIEDERMANN) = 1600, und im nüchternen Zustand ziemlich konstant.

Beziehungen zur Nahrung, Magenfunktion, Körpertemp. nicht vorhanden, nur zum Appetit und vielleicht zum Lebensalter, jüngere Personen weniger (GERNHARDT 75)). Auch bei Gesunden und bei derselben Person enorme Schwankungen zwischen 16000 und 500.000

---

63) ***E. Fischl, R. H. Kahn,*** Amylol. Wirksamk. des Kaninchenspeich. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER), **225,** 694 (1930). — 64) ***C. Schwarz, E. Jungherr,*** Flotzmauldrüsen-sekret beim Rind. Fermentforsch., **7,** 270 (1923). — 65) ***Joh. Junold,*** Diast. F. im Speichel anurer Amphib. Diss. Leipzig 1933; BPh. **88,** 286. — 66) ***E. J. Lesser,*** Diastasesekretion I (Speicheldrüse). Bioch. Zs., **184,** 125 (1927). — 67) ***V. Zagami,*** Pot. amilolit. di alc. secr. digerenti etc. Arch. di Farm., **41,** 151 (1926). — 68) ***A. Trautmann,*** Sekretion der Parotis des Schweines. Arch. Tierernähr., **7,** 216 (1932). S.A. — 69) ***K. Bode,*** Sekr. der Parotis des Schweines. Diss. Hannover 1932; BPh **69,** 510. — 70) ***H. Hencke,*** Sekr. der Gl. mandibul. etc. des Schweines. Diss. Hannover 1930. S.A. — 71) ***C. Cocchi,*** Amil. n. saliva del bambino, Riv. clin. pediatr., **22,** 449 (1924); BPh **29,** 463. — 72) ***W. B. Mayer,*** Amyl. conc. in the saliva of infants etc. Bull. John Hopk. Hosp., **44,** 246 (1929). — 73) ***G. Hensel,*** Diastasegeh. des Speich. bei Frühgeborenen. Zs. Kind., **54,** 367 (1933); BPh **73,** 548. — 74) ***E. Solms,*** Ptyalin-unt. bei Gesunden u. Kranken. Arch. Verdau., **43,** 429 (1928). — 75) ***A. Gernhardt,*** Ptyalingeh. des menschl. Mundspeich. Zs. klin. Med., **124,** 153 (1933).

(SOLMS 74)), bei GERNHARDT 48—133 mg Maltose, also viel enger. ZAGAMI 76) hat bei derselben Versuchsperson durch direkte Sondirung Parotis-speichel gewonnen nach Reizung mit NaCl, HCl, Chinin und Saccharose. Auf verschiedene gekochte Stärke-arten, sowie auf rohen Mais, Reis etc. zeigten sich verschieden starke Wirkungen; immer aber war der Säurespeichel am wirksamsten.

Organische Säuren haben keinen vermehrenden Einfluß auf die Speichelam., wie TÜRKHEIM 77) gegenüber einer Lehre von PICKERILL feststellt.

Zusammenhänge mit der Pankreasfunktion und endokrinen Regulationen. Es ist mehrfach versucht worden, die Sekretion der Speicheldrüsen mit dem Pankreas und zwar sowohl dessen äußerer Sekretion wie seiner endokrinen Wirkung und über letztere allgemeiner mit endokrinen Vorgängen in Verbindung zu bringen; jedoch liegen sichere Zusammenhänge weder in der einen noch in der anderen Richtung vor.

Abbindung der Pankreasgänge hat nach GAYDA 83) keinen Einfluß, eine Kompensation für den Ausfall der Pankreasam. tritt nicht ein, ebenso aber auch kein Übertritt der stark gesteigerten Blutam. in die Speicheldrüse, ebensowenig wie der von injicirter Am. (l. c. 57). Dagegen soll nach MOLNÁR 78) bei Sekretionsstörungen des Pankreas eine kompensirende Mehrausscheidung von Speichelam. erfolgen (sowohl nach Gangverschluß wie bei Parenchymerkrankungen und Tumoren).

Ebenso wenig klar ist die Beziehung zum endokrinen System. GAYDA 79) nimmt eine direkte hormonale Beeinflussung der Speicheldrüse durch das Pankreas an. Insulin in hohen Dosen bewirkt bei Hungerkaninchen während der Krampfperiode bei starker Herabsetzung der Speichelmenge eine sehr erhebliche Vermehrung der Am., bis auf das 17fache, während die Blutam. nicht vermehrt wird. GAYDA deutet dies als eine funktionelle Abwehrmaßnahme mit dem Ziele erhöhter Zuckerbildung. Seltsamerweise setzt aber auch Hyperglykämie die Speichelamylase herauf (Glucose-injektion, Adrenalin, Piqûre), bis auf das fünffache (80); dies soll dadurch geschehen, daß die Hyperglykämie die Insulinabgabe regulatorisch anregt. Entfernung der Nebenniere und Schilddrüse ohne Einfluß (vgl. bei Blut) (81, 82). Nach BETTÒLO 84) wirkt Insulin ebenso auch bei Diabetikern vermehrend bis auf das 6fache. Die geringe Vermehrung beim Diabetes an sich könnte bakterieller Herkunft sein.

Bei **Krankheiten** sind allerlei Befunde erhoben worden, die aber sichere Leitlinien nicht erkennen lassen. SOLMS 74) fand keinerlei regelmäßige Abweichungen, bis auf einen Fall von Anaemia perniciosa mit bisweilen fast völligem Fehlen. Auch BETTÒLO 85) fand keinerlei Beziehungen zu Krankheiten außer Erhöhung bei Diabetes (s. o.); auch keine zum Rhodan.

Bei Subacidität des Magens scheint häufig eine Verminderung einzutreten (SOLMS). DELHOUGNE 86) fand dementsprechend bei Hyperacidität Vermehrung und schließt auf eine halbwegs feste Beziehung zwischen Magen-HCl und Speichelam. Bei Hyperacidität Vermehrung auch ZOTTI 87); starke Abnahme bei Anacidität infolge von Tumoren. Dagegen hat die Verminderung bei der völligen Achylie bei Anaemia perniciosa EMERSON 88) vermißt, die

76) ***V. Zagami***, Pot. diastas. d. saliva parotidea umana etc. Arch. di Fis., **28**, 329 (1925); BPh **36**, 290. — 77) ***Türkheim***, Einw. von Säuren . . . auf die Speicheldiast. D. Monschr. Zahnhlk., **43**, 744 (1925); BPh **34**, 561. — 78) ***T. Molnár, E. Ungár***, Wechselwirk. der diastat. Fermentprod. des Pankreas und der Speicheldrüsen. Arch. Verdau, **50**, 295 (1931). — 79) ***T. Gayda***, Infl. dell'insulina s. pot. amilol. d. saliva. Arch. di Sci. Biol., **12**, 197 (1928). S.A. — 80) ***Ders.***, Infl. dell'iperglicemia s. pot. amil. d. saliva etc. Arch. di sci. Biol., **15**, 147 (1930). S.A. — 81) ***Ders.***, Infl. dell'asport. d. caps. surren. s. pot. amilol. d. saliva etc. ebd., **15**, 162 (1930). S.A. — 82) ***T. Gayda***, Infl. d. tiroidectomia s. pot. amilol. d. saliva e del sangue. Arch. di Sci. Biol., **17**, 206 (1932). S.A. —83) ***Ders.***, Infl. d. legatura del dotto pancr. s. pot. amilol. etc. ebd., **19**, 62 (1933). S.A. — 84) ***A. Bettòlo***, Az. dell'insulina s. pot. amilasico saliv. etc. Rass. Ter. Pat., **4**, 159 (1932); BPh **67**, 672. — 85) ***A. Bettòlo, U. Simonelli***, Ric. . . . diast. d. saliva etc. Rass. Ter. Pat., **4**, 321 (1932); BPh **70**, 702. — 86) ***F. Delhougne***, Verh. des Mundspeichels bei Magenkranken. Klin. Ws., **5**, 2437 (1926). — 87) ***R. Zotti***, Var. del pot. diast. della saliva etc. Rif. Med. **1929**, I, 707; BPh **52**, 260. — 88) ***Ch. P. Emerson Jr., O. M. Helmer***, Saliv. amyl. in . . . pern. anemia. Jl. Labor. Clin. Med., **19**, 504 (1934).

Werte liegen innerhalb derselben ja sehr großen Schwankungsbreite wie bei Normalen. INTROZZI 89) fand Erniedrigung im allgemeinen bei Schilddrüsenstörungen, Anaemien, Diabetes insipidus, Erhöhung bei Carcinom; Diabetes mellitus nur bei Jugendlichen, im übrigen sehr schwankende Werte.

Giftwirkungen. Pilocarpin und Neu-Cesol steigern bei nüchternen Menschen i. D. etwa auf das dreifache (GERNHARDT **90**)); früher hatte PERRIN **91**) angegeben, daß Pilocarpin meist die Am. herabsetzt, Atropin soll unwirksam sein.

Bosco **92**) behauptet, daß schon das Rauchen einer Zigarette täglich nach 20 Tagen die Am. auf Null reducirt, nach Einstellung des Rauchens nach mehr als 20 Tagen wieder normal secernirt wird. — SCHWARZ c. s. (l. c. 50) hatten Tabakrauchen ohne jeden Einfluß gefunden.

Speichelamylase im Magen. Die im H.W. S. 721 behandelte Frage ist immer noch nicht restlos geklärt, wahrscheinlich deshalb, weil es tatsächlich keine endgiltige Klärung gibt und sich eine Nachwirkung im Magen mal vorfindet, mal nicht, je nach der effektiven h des Mageninhalts, der Aktivirung der Reste des Ferments durch NaCl und Peptone u. dgl. Es ist also an sich richtig, wenn EGE **93**) (§§ 376, 382, 385) und SCHWARZ **94**) aus der Empfindlichkeit der Am. selbst gegen Wärme und Acidität den Schluß ziehen, daß sie der Magensaft zerstören muß; die Frage ist ja nur, wann diese Zerstörung eintritt, und ob nicht eben vorher noch eine erhebliche Stärkeverdauung im Magen statthaben kann, wie WOHLGEMUTH (*l. c. 554*) angegeben hat und NAKATSUKA **95**) neuerdings bestätigt. BERGEIM **96**) fand im menschlichen Magen binnen 15′ Verdauung von gekochten Kartoffeln zu 76 %, von Brot 60 % Maltose. Nach 30′ war die Am. irreversibel zerstört. Nach EGE **93**) wirkt im Magen ein kolloider Stabilisator bis zu einem gewissen Grade schützend. Vorkommen von Pankreasamylase im Magen beim Hunde s. § 401 (l. c. 101).

Mit dem sog. Blutgruppenferment im Speichel hat die Am. nichts zu tun (SIEVERS **97**)).

2) Pankreasamylase.

§ 401. Über die Biologie der Pankreasamylase ist seit der Darstellung im H.W. nicht viel gearbeitet worden. Das Interesse hat sich entweder der Erforschung des Fermentes selbst oder der Sekretion des Pankreas an sich zugewendet, auf die wir beim Trypsin zurückkommen.

Vorkommen. Pankreas vom Schwein wirkt fünfmal schneller als vom Hund, auf Kartoffelstärke besser als Gramineenstärke; rohe Stärke wird nicht angegriffen (ROMIJN **98, 99**)), vgl. § 374. Bei Fischen findet sich im Pankreas und Galle reichlich Am. bei lebhaften Fischen, am meisten *Scomber scombrus* (Makrele), weniger bei sehr trägen, wie *Opsanus tau*; ihre Menge soll also vom gesamten Energieverbrauch ab-

---

89) ***P. Introzzi, A. Mariani,*** Pot. amilol. d. saliva e del siero etc. Clin. Med. Ital., **66**, 403 (1935); BPh 88, 428. — 90) ***A. Gernhardt,*** Einw. des Pilocarpins etc. auf den Amyl.-Geh. des menschl. Mundspeichels. Zs. klin. Med., **123**, 16 (1933). — 91) ***A. Perrin,*** Ferm. amilol. nella saliva etc. Boll. Soc. Med. Pavia, **37**, 461 (1925); BPh **33**, 898. — 92) ***I. Bosco,*** Infl. del fumo di tab. s. pot. amilol. d. saliva. Riv. Pat. Sper., **5**, 187 (1930); BPh **57**, 152. — 93) ***R. Ege,*** Einfl. der Reaktion auf die Zerstör. des Ptyalins. Bioch. Zs., **244**, 243 (1932). S.A. — 94) ***C. Schwarz, E. Gewiss,*** Möglichkeit der Reaktiv. der ... Speichelamyl. Fermentforsch., **9**, 57 (1927). — 95) ***Sh. Nakatsuka,*** Act. of saliva on starch in the stomach. Mitt. Med. Ac. Kyoto, **5** (1931); BPh **63**, 107. — 96) ***O. Bergeim,*** Saliv. dig. in the human stomach. Arch. of int. med., **37**, 110 (1926); BPh **37**, 121. — 97) ***O. Sievers,*** Geh. des Speichels an sog. Blutgruppenferm. Klin. Ws. **1934**, II, 1640. — 98) ***C. Romijn,*** Pankreasamylase bij den hond etc. Ned. Tijdschr. Gen. **1933**, 3724. — 99) ***Ders.,*** Amylol. act. of the pancreas etc. Acta brev. neerl. physiol., **3**, 93 (1933).

hängen (CHESLEY 100)). Opt. ph 7,2, NaCl aktivirt in etwas höheren Konz. als bei Säugetieren. Verhältnis zur Maltase bei Fischen und Amphibien (VONK) s. S. 251. Bei Schildkröten (*Emys, Testudo*) reichlich vorhanden, opt. ph = 5,6. (**100a**)).

Auf aus dem Darm zurückgetretene Pankreasam. ist nach SCHWARZ **101**) die geleg. beobachtete sehr schwache Amylase im **Magen** des Hundes zurückzuführen.

Zur **Sekretion** gibt ZAGAMI **102**) an, daß die Am. (Hund) auch nach der Nahrungsaufnahme steigt wie beim Speichel, aber länger (450′) auf der Höhe bleibt.

Verschiedenheiten der Wirkung. In umfangreichen Versuchen an verschiedenen Stärkearten bemüht sich ZAGAMI **103**) nachzuweisen, daß beim Hunde Pankreas anders wirkt als Darmsaft, und Mensch anders als Hund. Da nicht für gleiche Bedingungen (ph, Elektrolyte) gesorgt war, haben die Versuche keinen Wert.

Für die Wirkung der Pankreasam. bei der Verdauung wichtig sind die Versuche von STRASBURGER **104/5**), der zeigte, daß die Darmfermente die Stärke auch aus geschlossenen Pflanzenzellen herausholen, wenn auch viel langsamer; es wurde dies sowohl in vitro (auch mit Speichel) wie an Menschen mit Dünndarmfisteln beobachtet. Trypsinbehandlung steigert die Auslösung, Pepsin ist ohne Einfluß (STRAUSS **106**)). Kritik von MANGOLD **106a**).

Eine Rückresorption einmal in den Darm ausgeschiedener Am. findet nicht statt, der Übergang ins Blut erfolgt nur direkt aus der Drüse (HENNING **107**)).

Zusammenhänge mit endokrinen Vorgängen. Nach Thyroxin-injectionen (3—9 mg) beim Hunde sah Scoz **108**) eine Herabsetzung der amylatischen Wirkung des Pankreasextraktes, entsprechend der klinischen Tatsache, daß Hyperthyreosen die Ausnützung der Nahrung verschlechtern; die Minderung betrug bis zu 80 % (Zuckerbestimmung). Im Blutserum dasselbe bei fortgesetzter Darreichung.

Ebenso wie man die Speichel-am. mit der inneren Sekretion des Pankreas in Beziehung gesetzt hat (l. c. 80—82), so versucht man es auch, Zusammenhänge zwischen innerer und äußerer Sekretion des Pankreas selbst aufzudecken. FERRARI **108a**) fand bei Fistelhunden nach Insulin eine Steigerung der Am. bis auf das 20fache; es ist keine Wirkung der Hypoglykämie, sondern eine direkte, denn Hyperglykämie wirkt auch vermehrend; es ist wie beim Speichel (l. c. 79) eine Abwehrreaktion.

BETTONI **109**) fand bei allen Diabetikern erniedrigten Amylasegehalt nicht nur in Blut und Harn als indirekten Beleg für eine verminderte Produktion, sondern auch in den Faeces. Nach Insulin stieg er auf das 3- bis 4-fache. 2 Fälle von hypophysärem Diabetes zeigten unbehandelt hohe Werte; JACONO **110**) fand die Verminderung auch im Darmsaft, unabhängig von der Schwere der Krankheit. Vgl. a. §§ 402, 403. Bei **Vergiftung** mit NaF (*Cavia*) war die Am. in Extrakten aus Pankreas und Dünndarm herabgesetzt (**111**).

---

100) ***L. C. Chesley***, Concentr. of... amylases etc. in... fishes. Biol. Bull., **66**, 133 (1934). — 100a) ***H. P. Wolvekamp jr.***, KH-Verdau. im Darm der Schildkröte, Zs. vgl. Phys. 7, 453 (1928). S.A. — 101) ***C. Schwarz, W. Kaus***, Amyl. im Magen des Hundes. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER), **213**, 577 (1926). — 102) ***V. Zagami***, Pot. amilol. di alcuni secreti diger. etc. Arch. di Farm., **41**, 151 (1926). — 103) ***V. Zagami***, Pot. amilol. del secr. pancr. (succo duod.) etc. Arch. di Fis., **23**, 355, 365 (1925); BPh **36**, 488/9. — 104) ***J. Strasburger***, Verdau. von Stärke aus geschloss. Pflanzenzellen etc. D. med. Ws., **1927**, 1681. — 105) ***Ders.***, dass. Arch. Verdau., **41**, 1 (1927). — 106) ***L. Strauss***, Verdau. aus geschloss. Pflanzenzellen etc. ebd., **41**, 11 (1927). — 106a) ***E. Mangold***, Eindringen von Verdau. Ferm. in Zellen etc. Med. Klinik, **1935**, I, 540; BPh 88, 579. — 107) ***N. Henning, E. Bach***, Resorpt. diast. F. im menschl. Darm. D. Arch. klin. Med., **168**, 374 (1930). — 108) ***G. Scoz***, Az. della tiroxina sull'amilasi etc. Boll. Soc. Ital. Biol., **9**, 971 (1934); Arch. di Sci. Biol., **20**, 253 (1934). — 108a) ***R. Ferrari***, Infl. d. insulina s. secr. dei ferm. d. succo pancr. Arch. di Fis., **35**, 145 (1935). S.A. — 109) ***I. Bettoni***, Correl. tra la secr. esterna e int. del pancr. etc. Arch. di Pat., **10**, 615 (1931); BPh **64**, 313. — 110) ***G. Iacono***, Secr. est. del pancr. nel diabete. Policlin. Sez. prat. **1932**, 133; BPh **66**, 745. — 111) ***A. Costantini***, Ferm. digerenti nell'intoss. sper. da NaF. Boll. Soc. Ital. Biol., **9**, 916 (1934).

3) Amylase des Darmes.

§ **402**. Hier ist nur weniges nachzutragen. ANDREJEW c.s. **112**) fanden beim Hunde mit THIRY-VELLA-Fistel Abhängigkeit von der Ernährung: Brot-Milchkost mehr als Fleisch. Am. ist abhängig vom Stärkegehalt der Nahrung; die Zunahme tritt um so später ein, je tiefer die Darmfistel liegt; nach 120 cm vom Duodenum kein Einfluß mehr (**113**). Die Menge im Darmsaft (Hund) steigt nach der Nahrungsaufnahme in analoger Weise an wie die des Speichels, klingt schneller ab als bei Pankreas (ZAGAMI, l. c. 103). Menschlicher Duodenalsaft soll auf verschiedene Stärkearten anders wirken als beim Hund (ZAGAMI, l. c. 103). Vorkommen bei Schildkröten zweifelhaft (l. c. 100a).

GARRY **114**) hat die Am. des Duodenums bei Krankheiten des Pankreas, Ulcus duodeni, Leber- und Gallenaffektionen bestimmt; keine charakteristischen Ausschläge.

4) Amylase der Faeces.

§ **403**. Die recht zweifelhaften analytischen Bestimmungen der Am. im Kot zu diagnostischen Zwecken werden von den Klinikern immer noch fortgesetzt, obgleich man wirklich nicht wissen kann, was man da eigentlich bestimmt, ob Pankreas-amylase (die man bestimmen möchte) oder die von Bakterien oder Leucocyten.

Weitere Angaben finden sich bei den unter „Blut" und „Harn" angezogenen Arbeiten, bei denen bisweilen auch die Am. der Faeces bestimmt wurde. WOLFER **115**) will die Methode nur dann angewendet wissen, wenn die Sekretion so schwer gestört ist, daß man kein Sekret mehr aus dem Duodenum gewinnen kann. Nach GARRY **114**) sind die Werte bei allerlei Krankheiten regellos wechselnd. Angebliche Verminderung bei Diabetes (l. c. 109).
Methodisches: die sauren fettsauren Salze hemmen, was zu beachten ist, da infolgedessen in manchen Faeces, z. B. bei Icterus, die Am. scheinbar fehlt (FRANK **116**)). Ausschütteln mit Aether beseitigt den Fehler; dasselbe empfiehlt SOTGIU **117**).

Bei Neugeborenen sehr gering, steigt dann immer mehr an (OKADA **118**)).

5) Leberamylase.

§ **404**. Wir geben hier nur die einzelnen Daten, soweit sie sich auf Versuche am Leberferment selbst und die Glykogenspaltung erstrecken. Auf die Bedeutung der Leberamylase als Glied der verwickelten Regulations-mechanismen des Kohlenhydratstoffwechsels gehen wir hier nicht ein; darüber eine ganz aphoristische Übersicht § 410. Nach EADIE **119**) soll die Leberam. von der des Blutes verschieden sein, da sie ein ph-Opt. von 5,95 hat, während die Am. aus nicht blutfrei gewaschener Leber ein zweites Opt. bei 6,8 hat. Nach DAVENPORT **120**) ist die Amylasewirkung der Leber nur 1/50 von der des Blutes.

---

112) ***S. Andrejew, S. Georgiewsky,*** Abhäng. der ferm. Fähigk. des Darmsaftes etc. I. Amylol. Ferm. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER), **280,** 33 (1932). S.A. — 113) ***S. Georgiewsky, S. Andrejew,*** Abh. der amylol. Fähigkeit des Darmsaftes etc. ebd. **235,** 428 (1935). S.A. — 114) ***G. Garry,*** Diagnost. Bed. der Diastasewerte. Arch. Klin. Chir. **174,** 378 (1933). — 115) ***I. A. Wolfer, L. W. Christian,*** Pancr.function tests etc. Arch. of Surg., **17,** 899 (1928); BPh **49,** 766. — 116) ***N. Frank, Fr. Doleschall,*** Diast. Best. im Stuhl. Bioch. Zs., **155,** 125 (1925); auch Mag. Orv. Arch., **25,** 397; BPh **38,** 385. — 117) ***G. Sotgiu,*** Determ. d. diastasi etc. Probl. alim., **2,** 257 (1932); BPh **73,** 753. — 118) ***K. Okada,*** Harnamyl. japan. Säugl. etc. Mitt. Med. Ak. Kyoto, **6,** 2705 (1932); BPh **72,** 728. — 119) ***G. S. Eadie,*** Liver amylase, Biochem. Jl., **21,** 314 (1927). — 120) ***H. A. Davenport,*** Liver amylase etc. Jl. of Biol. Chem., **70,** 625 (1926).

Bei der Autolyse der Leber soll die Am. am besten bei Luftabschluß wirken (?) (MURLIN 121)). — Angeblicher Nachweis der beiden Arten von Am. in ziemlich undurchsichtigen Versuchen über Verschiebungen zwischen Jodreaktion und Maltosebildung HOLLANDER 122).

Die Am. ist teilweise gebunden und wird erst allmählich durch Autolyse frei (POPPER, l. c. 136); jedoch ist die Freilegung nach 18 h. insofern abgeschlossen, als Zerstörung der Zellstruktur durch flüss. Luft keine weitere Am. mehr freisetzt (MAJER 123)). Die Desmo-am. werden dabei natürlich nicht frei. Über die Vorstellungen LESSER's betr. die Bedeutung dieser intravitalen Bindung für die Glykogenolyse s. § 410.

Beziehungen zur Ernährung und zur allgemeinen Leberfunktion. SCHARLES c. s. 124) geben an, daß bei Mäusen nach Fütterung die Am. stark ansteigt, ebenso steigt sie an, wenn Glykogen zu- oder abnimmt. Insulin hemmt die Erhöhung nach Fütterung, ebenso sinkt die Am. nach Fütterung bei thyreotoxischen Tieren, bei Nüchterntieren steigert Thyroxin; Adrenalin ohne Einfluß.

Schwangerschaft: starker Anstieg bis auf das Vierfache (Kaninchen); post partum schneller Abfall (YOKOTA 125)). Bei Feten findet Abbau von Glykogen in der Leber statt, aber bei jungen wesentlich schwächer als bei älteren Feten oder Neugeborenen (HERTZ 126)); zum Teil liegt dies an einem ungünstigen ph, da sich bei optimaler Pufferung der Abbau auf das Dreifache steigern ließ.

Phosphorvergiftung: keine wesentliche Hemmung nach STAEMMLER 127); YOKOTA fand aber bei trächtigen Kaninchen erst eine starke Steigerung, dann Absinken.

Bei mit P vergifteten Kaninchen fand v. FALKENHAUSEN 128) bei der Durchströmung der Leber eine erhebliche Ausschwemmung von Am., wahrscheinlich aus zerfallenen Zellen stammend. Daraufhin hat ROSENFELD 129) eine sonderbare Theorie entwickelt. Bei P-Vergiftung soll mehr Amylase entstehen, welche „durch Ausschaltung der Leber die Glykogenbildung verhindert" und so indirekt zur Fett-infiltration führt. Diesem Prozeß entgegen im Sinne einer Begünstigung der Glykogenbildung wirkt Adrenalin oder eine „Antidiastase", die sich nach Injektion von Diastase ausbildet.

Urannitrat bewirkt bei trächtigen Kaninchen nach YOKOTA eine Steigerung bereits bei 2,5 mg/kg. — Phlorizin senkt den Gehalt nur dann, wenn bereits Verfettung eingetreten ist (SEYFARTH 130)).

§ 405. Insulin und Diabetes; Krankheiten. Die bereits im H.W. S. 738 behandelte feststehende Tatsache, daß nach Injektionen von Insulin die Glykogenolyse in der Leber gehemmt wird, wie die im Muskel auch, ist eine der wenigen sicheren Erkenntnisse des sonst noch durchaus verworrenen Insulinproblems. Auf die generelle Bedeutung dieser hormonalen Beeinflussung und des damit verbundenen Antagonismus zwischen Pankreas und Nebennierenmark kommen wir mit einigen Worten § 410 zurück. Hier geben wir zunächst rein referirend einige Daten, die sich einigermaßen ersichtlich direkt auf die Amylase der Leber beziehen lassen.

---

121) ***J. R. Murlin,*** Metabol. of carbohydr. in . . . liver brei. Amer. Jl. Phys., **93,** (Proc.) 677 (1930). — 122) ***L. Hollander,*** Amylase system of the liver. Science **1934,** I, 17. — 123) ***E. H. Majer,*** Diastase-Unt. in der Leber. Zs. exp. Med., **90,** 665 (1933). — 124) ***F. H. Scharles c.s.,*** Liver amylase. Amer. Jl. Phys. **111,** 130 (1935); BPh **88,** 233. — 125) ***T. Yokota,*** Hepat. funct. in pregnancy. II. Hepat. amyl. Jap. Jl. Obstetr.; **14,** 91 (1931); BPh **63,** 795. — 126) ***W. Hertz,*** Postmort. Glykogenschwund in der Leber etc. Zs. Kind., **55,** 410 (1933). — 127) ***M. Staemmler,*** Diast. F. in der Leber, bes. bei P-Vergift. Arch. Path. (VIRCHOW), **259,** 326 (1926). — 128 ***M. Frhr. v. Falkenhausen,*** Bez. der Leber zu . . . Diast. Geh. des Blutes etc. Arch. für exp. Path., **139,** 14 (1929). — 129) ***G. Rosenfeld,*** Ein- und Ausschaltung der Leber. Arch. für exp. Path., **166,** 205 (1932). — 130) ***W. Seyfarth,*** Menge der Organamylase etc. Arch. für exp. Path., **176,** 745 (1934).

In vitro haben weder Insulin noch Adrenalin auf das Ferment irgend einen Einfluß, auch eine Verschiebung des opt. ph tritt nicht ein; entgegengesetzte Angaben (**131, 132**)) beruhen auf einer Förderung durch Cl-Ionen (Eadie, Davenport, l. c. 119, 120). Eine Hemmung andererseits kann nach Smith **133**) dadurch vorgetäuscht werden, daß Insulin-präparate, besonders rohe, einen Hemmungskörper enthalten, der mit dem Hormon selbst nichts zu tun hat.

Eine Hemmung tritt also nur ein, wenn man Insulin dem lebenden Tiere einspritzt, und dies sicherzustellen hat man sich mit den verschiedensten Methoden bemüht, so durch Analysen der Leber selbst, der Zuckerabgabe ins Blut etc., sowie durch direkte Durchströmung der Leber mit Zusatz von Insulin. Einzelheiten werden wir § 410 geben, hier sei nur als Beispiel eine Arbeit von Molitor u. Pollak **134**) angeführt, die mit sorgfältiger Methodik bei Hund und Kaninchen die Zuckerabgabe ins Blut und den freien Leberzucker in der Norm und nach Insulin bestimmt haben. Die Werte sinken nach Insulin sofort, auch bei reichlichem Glykogengehalt der Leber, so daß die Autoren diese Erscheinung auf eine direkte Hemmung der Amylase beziehen möchten. Adrenalin wirkt wie längst bekannt antagonistisch. Wir erwähnen grade diese Arbeit hier eben wegen der Annahme, daß eine direkte Beeinflussung des Fermentes vorliegt, was an sich durchaus nicht die einzige Erklärung bietet. Darauf kommen wir § 410 zurück.

Die Insulinwirkung läßt sich nach Popper **135**) auch beim menschlichen **Diabetes** nachweisen. Der Amylasegehalt von Leichenlebern bei Diabetes liegt an der oberen Grenze der Norm; dagegen sind die Werte bei mit Insulin behandelten Fällen niedrig, besonders dann, wenn Insulin die Stoffwechsel-lage stark beeinflußt hat. Die Amylasewerte von Blut und Niere sind nicht beeinflußt (s. u.). In einer Leber eines 6 Monate alten Kindes, das an Insulinvergiftung gestorben war, fand Popper eine sehr weitgehende Hemmung.

Leberamylase bei sonstigen Krankheiten. Bei der sog. „Glykogenspeicher-Krankheit" ist die diastatische Tätigkeit der Organe an sich nicht aufgehoben, wie aus dem reichlichen Vorkommen in Blut und Harn hervorgeht (§§ 307, 308); s. a. die Diskussion der Sachlage bei Hertz (l. c. 126) **137**)). Für die Leber selbst ist die Frage zweifelhaft: Schönheimer **138**) fand keine Spaltung des zelleigenen Glykogens, wohl aber Unshelm **139**)) normale Spaltung löslicher Stärke. Es scheint sich also nicht um Fermentmangel, sondern eine allzu feste Bindung des Glykogens zu handeln, die es im Sinne v. Przylecki's unangreifbar macht.

Befunde an Leichenlebern: Im Anschluß an Popper **135**) über den Glykogengehalt von Lebern und Nieren haben Getreuer c.s. **140**) die Amylase geprüft. Meist Niere > Leber, bei Diabetes gleiche Werte; Insulinbehandlung Leber allein vermindert. Basedow, Pankreasnecrose Leber > Niere. Totale Hemmung nach Insulintod Popper (l. c. 136).

6) Amylase in sonstigen Organen.

§ 406. Das neue Material ist recht spärlich, was allerdings nicht zu verwundern ist. Denn daß Am. in jeder Zelle vorkommt, weiß man nun, so daß der bloße Nachweis

---

131) ***P. J. Cammidge, H. A. H. Howard,*** Infl. of insulin upon ... diastat. ferm. of the liver. Jl. of Metabol. res., **5**, 95 (1924). — **132**) ***M. B. Visscher,*** Opt. ph for glycogenase etc. Jl. of Biol. Chem., **69**, 3 (1926). — 133) ***W. Smith,*** Act. of insulin on liver diast. Jl. of Phys. (Proc.), **62**, III (1926). — 134) ***H. Molitor, L. Pollak,*** Zuckerhaushalt der Leber. Arch. für exp. Path., **154**, 280 (1930), **162**, 488 (1931). — 135) ***H. Popper, O. Wozasek,*** Glykogengehalt der Leichenleber, Zs. exp. Med., **77**, 414, **83**, 682. — 136) ***Dies.,*** Diastase-hemm. in der Leber ... Insulinhypoglyk. Arch. Path. (Virchow), **288**, 673 (1933); BPh **74**, 286. — 137) ***W. Hertz,*** Ferm.-Unters. bei Glykogenspeicherkrankheit. Klin. Ws. **1933**, II. 1725. — 138) ***R. Schönheimer,*** Eigenartige Störung des KH-Stoffwechsels. Zs. phys. Chem., **182**, 148 (1929). — 139) ***E. Unshelm,*** Glykogenkrankheit. Jb. Kind., **87**, 257 (1932). — 140) ***V. Getreuer, G. Obersohn,*** Diastat. Vermögen menschl. Leichenlebern etc. Zs. exp. Med., **96**, 51 (1935); BPh **87**, 327.

irgendwo ohne Interesse ist, und biologisch interessant sind schließlich nur die für den Glykogen-stoffwechsel entscheidenden Organe, also außer Leber eigentlich nur noch der Muskel; ferner haben noch die Am. der Tumoren einige Beachtung gefunden.

Eine vergleichende Untersuchung liegt von SEYFARTH (l. c. 130) vor. Bei Ratten waren an sich die Werte sehr schwankend; ein deutlicher Einfluß von ausschließlicher Fettfütterung ist nicht festzustellen; nur bei eingetretener Verfettung der Organe nach Phlorizin wird die Am. geringer. Am meisten enthält die Niere, bei Hunger abnehmend. LOPATIN **142)** gibt an, daß erwachsene Hunde mehr Am. haben als junge. Reihenfolge der Organe: Pankreas (200 mal mehr) > Niere, > Leber > Milz > Herz.

Die Am. der **Leukocyten** haben WILLSTÄTTER als Hauptobjekt für seine Untersuchungen über Lyo- und Desmo-amylasen gedient, s. § 376.

Muskel. Mit der Wirkungsweise der Muskelam. sind noch eine Reihe dunkler Probleme verknüpft, die direkt mit den Rätseln des KH-Stoffwechsels im Muskel, den Beziehungen zwischen Glykogenabbau und Zuckeroxydation, resp. der PASTEUR-MEYERHOF'schen Reaktion zusammenhängen. Wir können auf diese Dinge nur ganz kurz hinweisen, da ebensowohl die Tatsachen bestritten, wie ihre Deutung völlig unklar ist. Sie zielen darauf, den Nachweis zu führen, daß der Glykogenabbau im lebenden Muskel nicht „normal" verläuft, d. h. über Maltose zu Glucose, sondern daß er über andere Zwischenstufen, — die sich eventuell zu nachweisbaren Produkten anderer Art stabilisiren —, direkt zu gärungsfähigen oder oxydablen C_3-Stoffen führt. Dafür steht als unanfechtbare Tatsache zur Verfügung, daß der intakte Muskel beim Glykogenabbau niemals Glucose ins Blut abgibt (§ 410). Aber das kann ohne gedankliche Schwierigkeit durch den starken und einseitig gerichteten zymatischen Apparat des Muskels erklärt werden, der eben die primären labilen Abbaustoffe (§ 366a) sofort angreift, ehe sie Zeit haben sich — wie in der Leber — zu Glucopyranose zu stabilisiren. Alle diese Fragen sind noch recht unklar, wir kommen darauf beim Zuckerabbau eingehender zurück. Hier nur die wenigen Angaben zu diesem Thema.

LOHMANN **143)** hat sich als erster etwas genauer mit der Amylase des Muskels beschäftigt und eine Methode angegeben, aus Extrakten wirksame Präparate darzustellen. Von ihm stammen auch die ersten Beobachtungen über Abweichungen in der Wirkung. Beim Abbau von Glykogen erhielt er nämlich nicht die üblichen Spaltprodukte, also Maltose, sondern einen anderen Zucker, den er nicht ganz sicher als ein Trisaccharid identifiziren konnte. Diese Feststellung wurde von BARBOUR insofern vertieft, als er dieses Trisaccharid nicht nur als sicher erkannt, sondern sogar als einziges Produkt der Glykogenspaltung durch Muskelextrakt annimmt. Dies haben wir bereits §§ 368, 379 berichtet, ebenso, daß SOMOGYI erst ebenfalls dieses Trisaccharid als Produkt der Amylase des Blutes fand, dann aber später angab, daß er eine Art „Isomaltose" erhalten habe. Damit verliert der Befund seine spezielle Beziehung zur Amylase grade des Muskels und reiht sich ein in die lange Liste von Befunden über Isomaltosen bei jeglicher Art von Stärkeabbau, die immer noch dunkel sind.

Aber das Trisaccharid könnte trotzdem im Muskel eine gewisse Sonderbedeutung haben. Man könnte es mit den Angaben von MACLEOD **144/5)** in Verbindung bringen, daß der Muskel, besonders nach Insulinwirkung, ein besonderes Kohlenhydrat enthält, eine Zwischensubstanz zwischen Glykogen und vergärbarem Zucker, und daß es etwa die Rolle eines

142) ***G. Lopatin,*** Amylol. Fähigk. des Blutes und einiger Organe. Med. Biol. Ž. (russ.), **2,** 18; BPh **37, 420.** — 143) ***K. Lohmann,*** Hydrol. des Glykogens durch das diast. F. des Muskels. Bioch. Zs., **178, 444** (1926). — 144) ***J. L. Chaikoff, J. J. R. Macleod,*** Eff. of insulin on the resp. exchange etc. Jl. of Biol. Chem., **78, 725** (1927); s.a. Lancet **1929,** I, 108. — 145) ***W. W. Simpson, J. J. R. Macleod,*** Immed. prod. of post-mortem glycogenol. etc. Jl. of Phys., **64, 255** (1927).

besonders schnell mobilisirbaren Reservestoffes im Muskel spielen könnte (z. B. BISCHOFF 146)). Die Natur dieses KH war bisher nicht festzustellen, und seine Existenz überhaupt wird von CORI 147) bestritten: nach seinen Befunden lassen die Analysen von verschwundenem Glykogen einerseits, Auftreten von gärungsfähigem Zucker andererseits keine Lücke, die diese schwerwiegende Komplikation eines unfaßbaren KH notwendig machte. Das Einzige, was auch nach seinen Befunden wahrscheinlich ist (148)), ist eine vorübergehende Anhäufung von Zuckerphosphaten im Muskel unter Insulinwirkung, wenn man reichlich Zucker zur Verfügung stellt; s. a. die § 410 citirten Arbeiten von CORI, CORKILL u. a.

Eine Beziehung des Trisaccharids zu dem MACLEOD'schen KH könnte grade darin bestehen, daß es nach LOHMANN gegen Zymase resistent ist und nicht in die Glykolyse einbezogen wird; danach wäre es zwar als ein an sich unphysiologisches Stabilisirungsprodukt, aber doch als eine Art Reservestoff anzusehen, wenn es durch Amylase weiterhin spaltbar wäre. Aber auch seine Existenz überhaupt wird bestritten: CARRUTHERS 149) hat es nicht auffinden können, nach seiner Angabe verläuft die Glykogenspaltung im Muskelextrakt ganz normal, wird durch höhere Spaltprodukte, weniger durch Maltose gehemmt. Daß die Amylasewirkung im lebenden Muskel an sich betrachtet andere Wege gehen sollte, dafür liegen keine Anhaltspunkte vor; z. B. sind die typischen Muskelstoffe in vitro ohne Einfluß auf die Amylasen (FILIPOWICZ 150)).

Man könnte also dieses fragliche Trisaccharid als untypisch für den Muskel hier ganz bei Seite stellen, wenn man nicht andererseits seine Existenz mit der ebenfalls auffallenden Tatsache in Verbindung gebracht hätte, daß zugesetzte Diastasen, z. B. Pankreas-amylase, die Glykolyse hemmen, sowohl im Muskel (CASE 151/2)) wie in Tumorschnitten (THURLOW-HARRISON 153)). Die Tatsache scheint festzustehen, ihre Deutung ist unklar und strittig.

THURLOW-HARRISON denkt an einfache Bildung erhalten bleibender Maltose durch Wirkung der fremden Amylase, die mangels einer Maltase im Muskel als solche für den Muskel unzugänglich sei. CASE aber hält dies für unwahrscheinlich und zieht nun eben das BARBOUR'sche Trisaccharid hinein. Es ist ein unphysiologisches Produkt, das nun die Glykolyse hemmt. Bei normalem Verlauf der mit sofortiger Glykolyse gekoppelten Glykogenspaltung tritt somit dieses Produkt garnicht auf. Die eigentlich vitale Glykogenspaltung im Muskel verläuft also anders, als die gewöhnliche außerhalb der Zelle verlaufende Spaltung durch Amylase. Er nimmt an, daß im Muskel Amylase und Zymase sozusagen als Mischkatalysatoren auf einem Träger wirken, so daß die ersten Produkte des Glykogenabbaus automatisch und sofort glykolysirt werden. Darüber s. § 379. Eine Aufklärung dieser sehr unklaren Dinge wäre ebenso interessant für den Stärkeabbau an sich wie für den Verlauf der Prozesse im Muskel.

Hierzu nur noch eine Angabe von RONZONI 154), daß im Gegensatz dazu zugefügte Amylase im Muskelextrakt durch Vermehrung des Glykogenabbaus die Phosphorylirung dann fördert, wenn die eigene Amylase im Extrakt schwach ist. CASE konnte dies nicht bestätigen.

Auf den auch am Muskel nachweisbaren Antagonismus zwischen Insulin (hemmend) und Adrenalin (fördernd) kommen wir im Zusammenhang § 410 zurück. Hier nur noch eine Angabe von RIESSER 155), daß Adrenalin in 1 h völligen Schwund des Glykogens bewirken

---

146) ***Fr. Bischoff, M. L. Long,*** Eff. of adrenalin upon the free muscle sugar and tot. carboh. Jl. of Biol. Chem., **95**, 743 (1932). — 147) ***C. F. Cori, G. T. Cori,*** Compar. of total carboh. and glycog. cont. of mamm. muscle. Jl. of Biol. Chem., **100**, 323 (1933). — 148) ***C. F. Cori, G. T. Cori,*** Plasmaphosphate und Milchsäure etc. Arch. für exp. Path., **172**, 249 (1933). — 149) ***A. Carruthers, Wei Yung Lee,*** Hydrol. of glycogen by glycerol extract of muscle. Jl. of Biol. Chem., **108**, 525, 535 (1935); BPh **88**, 348. — 150) ***Br. Filipowicz,*** Wirk. chem. Muskelkompon. auf die Amyl. Bioch. Zs., **275**, 55 (1934). S.A. — 151) ***E. M. Case, D. R. Mc Cullagh,*** Pancr. extr. in rel. to lactic acid form. in muscle. Biochem. Jl. **22**, 1060 (1928). — 152) ***E. M. Case,*** Rel. betw. amyl. and lactic acid form. in muscle. ebd., **25**, 561 (1931). — 153) ***S. Thurlow-Harrison, E. Mellanby,*** Inhib. of lactic acid form. etc. ebd., **24**, 141 (1930). — 154) ***E. Ronzoni,*** Eff. of amyl. in form. of hexose-phosphate by muscle extr. Proc. Soc. Exp. Biol., **26**, 356 (1929). — 155) ***O. Riesser, K. Yamada,*** Beeinfl. des Muskelchem. durch . . . veget. Gifte. Arch. für exp. Path., **170**, 208 (1933).

Abgeschlossen: 21. 12. 35. Ber. Phys. 89. H. 1/2.

kann, und daß Acetylcholin ebenso wirkt, aber nicht direkt, sondern nur weil es zur Ausschüttung von Adrenalin führt. — Atropin bewirkt starke Zunahme des Glykogens.

Im **Herzen** fand LOEPER **156)** Amylase, im nodalen Gewebe weniger als in anderen Abschnitten des Muskelgewebes.

Magenschleimhaut. Beim Rind fand SALVIETTI **157)** Am. im Pansen, Blattmagen und Abomasus; im letzteren mehr in der Nähe des Pylorus, während das F. in den beiden anderen Magenteilen vom proximalen Teil zum distalen abnimmt. Uterusschleimhaut und -Sekret enthalten Am., besonders in der Proliferationsphase (SAITO **158)**); NAKAHORI **159)** fand mehr in der Sekretionsphase des Cyclus.

Haut. In Dialysaten lebender Haut fand OTTENSTEIN **160)** Amylase, ebenso im Schweiß. Bestrahlung vermindert. Zuckerbelastung steigert; nach Insulin erst Zunahme, dann Absinken unter die Norm. Diabetes hohe Nüchternwerte, bei Zuckerbelastung abnorme Kurven. Knorpel (Ochse) enthält nach LOEPER **161)** Am.

Tumoren. SCHARLES **162)** hat die Am. aus Mäuse-sarkom genauer untersucht. Opt. Temp. 48—50°, opt. ph. 6,2. Je älter der Tumor, desto höher der Am.-Wert. Hunger, Röntgenbestrahlung, Gifte (HCN, Jodessigsäure) ohne Einfluß; Insulin nur über die Krampfwirkung steigernd. Adrenalin unwirksam, Thyroxin starke Steigerung; in vitro auf die Am. selbst sämtlich ohne Einfluß. Besondere Versuche zeigten, daß die Schwankungen auf den wahren Fermentgehalt, nicht auf Begleitstoffe zu beziehen sind.

In Carcinomen (Jodmethode) schwankende Mengen (NAKAHORI **159)**), junge mehr als alte. Im allgemeinen keine wesentlichen Abweichungen vom normalen Gehalt des betroffenen Organs (Uterus, Lymphdrüsen); dasselbe fand MIYAMA **163)** beim Sarkom des Kaninchens, kein Unterschied zwischen gesundem und nekrotischen Gewebe.

7) Amylase des Blutes.

§ 407. Methodisches als Ergänzung zu § 377. MYERS **164)** hat die üblichen Methoden verglichen.

Er empfiehlt Zuckerbestimmung nach HAGEDORN-JENSEN oder MYERS-KILIAN oder Viscosimetrie nach ELMAN **165)**, die aber bei kleinen Mengen Am. unbrauchbar ist. Die Methode OTTENSTEIN (**166)**, l. c. 199) wird ebenfalls von MYERS empfohlen, aber nur 15 Min. Incubation anstatt 2 h. Empfehlung derselben Methode auch für klinische Untersuchungen BRINCK **167)**; es genügt 0,1 ccm Blut. Genaue Anweisungen, Hinweis auf Fehlerquellen, bes. Abhängigkeit von der Temp. **168)**.

Jodmethoden: Modifikationen SCHAANNING **169)**, SOMOGYI **170)**. (Anwendung von Stärkekleister, bestimmte Mengen von Blut und Substrat). Viscosimetrische Präzisionsmethode THOMPSON **171)**.

---

156) ***M. Loeper, A. Lemaire, J. Tonnet,*** Amyl. du coeur. Soc. Biol., **108,** 211 (1930). — 157) ***M. Salvietti,*** Ferm. dig. n. stomaco dei bovini. Riv. di biol., **14,** 1 (1932). S.A. — 158) ***O. Saito,*** Amyl. in der Uterusschleimh. Okayama Jg. Zasshi (jap.) **1926,** 261; BPh **38,** 290. — 159) ***K. Nakahori,*** Ferm. in the uterine cancer. I. Amylase. Jap. Jl. Obst., **17,** 215 (1934); BPh 85, 278. — 160) ***B. Ottenstein,*** Gehalt der Haut etc. an diastat. F. Bioch. Zs., **240,** 328, 344 (1931). — 161) ***M. Loeper c.s.,*** Ferm. du cartilage. Soc. Biol., **116,** 116 (1934); BPh **81,** 521. — 162) ***F. H. Scharles, W. T, Salter, (Ph. D. Robb),*** Tumor amylases. Am. Jl. Cancer, **20,** 613, 625, **23,** 322 (1934/5); BPh **82,** 51, 52, **88,** 544. — 163) ***K. Miyama,*** Ferm. des Kaninchensarkoms. Sei-i-Kwai Med. Jl., **53,** H. 6 (1934); Chem. Zbl. **1935,** I, 1256. — 164) ***V. C. Myers, E. Reid,*** Stud. on animal diast. Jl. of Biol. Chem. **99,** 595 (1933). — 165) ***R. Elman, J. M. Mc Caughan,*** Quant. determ. of blood amylase. Arch. of Int. Med., **40,** 58 (1927); BPh **48,** 676. — 166) ***B. Ottenstein,*** Diastase und Haut. Klin. Ws., **1931,** 1114. — 167) ***J. Brinck,*** Diastasebest. im Blut nach Ottenstein. Klin. Ws. **1934,** II, 1686. — 168) ***F. Baltzer, J. Brinck,*** Diastasebest. im Blut. ebd. **1935,** I, 929. — 169) ***Ch. K. Schaanning,*** Diastase im Serum etc. Norsk Mag. laegevid., **88,** 612, BPh **46,** 776. — 170) ***M. Somogyi,*** Studies on blood diast. Proc. Soc. Exp. Biol., **29,** 1126 (1932). — 171) ***W. R. Thompson, R. Tennant, C. H. Wies,*** Prec. meth. for the estim. of amylol. activ. etc. Jl. of Biol. Chem., **108,** 85 (1935).

Da das Vorkommen von Am. im Blute als solches überall gesichert ist, hat der bloße Nachweis kein Interesse mehr, und derartige Arbeiten liegen auch kaum vor. Nach Lo Monaco **172)** ist Schweineserum viel reicher als Rinderserum.

Entsprechend älteren Angaben (H.W. S. 731) findet sich Blutamylase bei Säuglingen nur wenig, auch bei Kindern im ersten Lebensjahr nur wenig steigend. Nach Guest **173)** bei Kindern bis zu 2 Jahren starke Schwankungen; im Allgemeinen bei gut ernährten mehr Am. als bei gestörten. Normale Menge beim Menschen nach Methode Ottenstein 150—220 mg-% Glucose **(167)**; in Wohlgemuth-Werten D = 8 bis 16, nach Germer bis 22 **(174)**. Verteilung im Vollblut nach Somogyi **170)** 80% im Plasma, 20% in den BK.

Abhängigkeit von physiologischen Bedingungen. Die bei allen Blutfermenten unklare Frage, ob sie eine Funktion haben oder nur Ausschwemmungsprodukte der Organe sind, steht hier noch ebenso offen wie im H.W. Da die Leber sehr viel Blutamylase mit sich führt, so besteht die Möglichkeit, daß hier die Blutam. am Glykogenabbau mitwirkt, um so mehr als die Blutgefässe der Leber selbst ein Polysaccharid enthalten (Macleod 1917); aber sicher ist auch das für die Norm nicht; eher für pathologische Verhältnisse; so fand Wohlgemuth (*l. c. 744*) bei sehr reichlicher Blutamylase nach Pankreasstauung Glykogenschwund in der Leber. Auch die Versuche, feste Relationen zwischen irgend welchen normalen oder pathologischen Organvorgängen — außer dem Pankreas — aufzufinden, sind vergeblich gewesen. So sei hier nur Einiges ergänzt.

Kein Parallelismus zwischen Blut und Harn in bezug auf Am., z. B. Rinderharn ebensoviel wie Schwein trotz viel geringerer Menge im Blut (Lo Monaco **172)**). Weiteres s. bei Harn § 408. Keine Abhängigkeit von Tageszeit, Alter, Geschlecht (Germer **174)**); von Ernährung oder Nüchternheit (Hund, Viscosim. Messung) Elman **165)**, Cohen **175)**, Germer **174)** (Mensch); auch Strasser **176)** findet höchstens eine geringe Zunahme nach KH-reicher Nahrung; schon relativ geringe Erhöhungen auf etwa das Doppelte erregen Verdacht auf Pankreaserkrankung. Reid **177)** findet sogar eine Verminderung nach Nahrungsaufnahme, auch bei Injectionen von Zucker (Hund); ebenso Minker-Bogdanowa **178)** bei Zuckerbelastung; die Am. soll in die Leber abwandern, weil sie dort gebraucht wird. Abfall bei Zuckerbelastung bestätigt (Goldschmidt-Fürstner **179)**) (s. dazu auch l. c. 202—205).

Schwangerschaft an sich beeinflußt nach Spitzer **180)** nicht (Jodmethode); Steigerung bei Eklampsie selten, meist nur im Harn erhöht. Nach Goldschmidt-Fürstner **179)**) sinkt Am. in der Norm vom 7. Monat ab auf fast die Hälfte, steigt nach der Geburt wieder an (Methode Ottenstein).

Nach häufig wiederholten Aderlässen **(181)** keine regelmäßigen Änderungen, der Amylasegehalt bleibt stets etwa dem Proteingehalt des Serums parallel. Minima zwischen der 4. und 6., sowie 30 bis 40. Blutentnahme. Bei Schwitzbädern Verminderung **(182)**.

---

172) ***Lo Monaco, R. Micale,*** Amil. del. siero etc. Boll. Soc. Ital. Biol., **2,** 215 (1927); BPh **43,** 99. — 173) ***G. M. Guest,*** Diast. activ. of the blood in infants. Proc. Soc. Exp. Biol., **23,** 710 (1926); BPh **38,** 88. — 174) ***K. Germer,*** Diast. Menge im Blut und Urin etc. Hosp. Tid. (dänisch) **1931,** II, 951; BPh **66,** 123. — 175) ***I. Cohen,*** Var. in the blood . . . diast. in rel. to meals. Brit. Jl. Exp. Path., **6,** 173 (1925); BPh **35,** 107. — 176) ***v. Strasser,*** Diastat. F. im Blute. D. Arch. klin. Med., **151,** 110 (1926). — 177) ***Ch. Reid, B. Narayana,*** Blood diastase. Quart. Jl. exp. Phys., **20,** 305 (1930). — 178) ***E. Minker-Bogdanova,*** Amyl. des Blutes. Russk. fiziol. Ž., **13,** 750 (1930); BPh **61,** 296. — 179) ***P. Goldschmidt-Fürstner,*** KH-Stoffw. währ. der Schwangersch. Arch. für Gynäkol., **153,** 417, 427 (1933). — 180) ***W. Spitzer,*** Diast. in . . . Schwangersch. Arch. für Gynäkol., **150,** 681 (1932). — 181) ***Brocq-Rousseu, Z. Gruzewska, G. Roussel,*** Amylase du sérum de cheval. C. R., **189,** 501, 589, 1203 (1929), **192,** 897 (1931). — 182) ***A. Marchionini, B. Ottenstein,*** Stoffwechs. Unt. bei Schwitzbädern III. Amylase. Zs. physikal. Ther., **44,** 69 (1933); BPh **77,** 117.

UV-Bestrahlung des Blutes bewirkt eine Zunahme der Aktivität, nicht der absoluten Menge, infolge von desorbirenden Vorgängen an den Kolloiden des Blutes, eine Abnahme der Dispersität, die auch sonst beobachtet wird (ZAHORSKI **183**)).

Herkunft der Blutamylase. Hier stehen wir vor derselben Frage, wie wir sie bei der Blutlipase behandelt haben, ob das Pankreas die einzige Quelle ist. Hierzu sei bemerkt, daß nach THOMPSON (l. c. 171) die Serumamylase ihren Eigenschaften nach völlig der Pankreasam. gleich ist, was aber auch nicht viel besagen will, denn die Eigenschaften der Organamylasen, wenn sie überhaupt mal frei im Blute sind, können nicht so weit von einander abweichen, daß man daraus auf die Herkunft Schlüsse ziehen kann. GARGASOLE **184**) wird also wohl Recht haben, wenn er die Meinung vertritt, daß zwar die Hauptmenge aus dem Pankreas stammt, aber auch Speicheldrüse und Leber Anteile liefern.

Für das **Pankreas** als Hauptquelle der Blutam. spricht die bereits im H.W. S. 732 als sicher hingestellte Tatsache, daß seine Absperrung vom Darmlumen durch Gangunterbindung eine erhebliche Zunahme der Am. zur folge hat. Dies ist seltsamerweise von REID **177**) nicht aufgefunden worden, sonst aber mehrfach bestätigt (**185—187**). Die Steigerung kann nach JOHNSON **188/9**) bis zum 20-fachen betragen; starke Erhöhungen fand auch MC CAUGHAN **190**). Natürlich handelt es sich nur um eine vorübergehende Erscheinung, nach etwa 12 Tagen ist der Gehalt wieder normal.

Dementsprechend führt Exstirpation des Pankreas zur Verminderung der Blutamylase. Einzige Angabe, daß keine Änderung auftritt, bei BRILL **191**), nachdem REID seine damit übereinstimmende Ansicht (l. c. 196) selbst berichtigt hat: er findet nun (**192**) ebenso wie LOPATIN (l. c. 142) Verminderung. Nach ZUMMO **186**) sehr schnelle Abnahme bis auf die Hälfte; bei längerem Überleben der Tiere noch weiteres Absinken.

Auch MARKOWITZ **193**) gibt Abnahme auf $^1/_3$ an, bei teilweiser Entfernung ganz unregelmäßige Werte. Ähnliche Angaben bei ZUCKER **187**). Rapider Abfall und schnelle Wiederherstellung bei Totalentfernung Mc CAUGHAN **190**).

Zusammenhang mit dem endokrinen System. Mit diesen Beobachtungen über den Zusammenhang der Konz. an Blutamylase mit dem Pankreas als Gesamtorgan oder seinem in der Norm nach außen gerichteten secernirenden Drüsenapparat hat man nun Beziehungen zum Pankreas als endokrinem Organ zu finden geglaubt, und dadurch wieder einmal eine der üblichen Verwirrungen hervorgerufen, wie wir sie immer wieder berichten müssen, wenn man die Bemühungen sieht, aus einfachen Beobachtungen über verschiedene „Mengen" von Fermenten an irgend einem leicht erreichbaren Ort Rückschlüsse zu ziehen auf die komplicirtesten Stoffwechselfragen. An sich ist es durchaus nicht ersichtlich, was die Tatsache, daß ein großer Teil der Blutamylase aus dem Pankreas als Sekretionsdrüse stammt, damit zu tun haben

---

183) ***W, Zahorski,*** Einfl. strahlender Energie auf das Blut. Polsk. Arch. Med., **12,** 303 (1934); BPh **83,** 10. — 184) ***D. Gargasole,*** Signific. ed. origine del f. diastas. nel sangue. Rass. Ter. Pat., **5,** 16 (1933); BPh **73,** 549. — 185 ***T. Gayda,*** Infl. d. legat. del dotto pancr. sul pot. amilol. etc. Arch. di Sci. Biol., **19,** 62 (1933). S.A. — 186) ***C. Zummo,*** Infl. d. pancr. sull. amil. serica. Boll. Soc. Ital. Biol., **2,** 333, 335 (1927); BPh **42,** 523. — 187) ***T. F. Zucker, P. G. Newburger, B. N. Berg,*** Amylase of serum etc. Amer. Jl. Phys., **102,** 209 (1932). — 188) ***C. E. Johnson, C. H. Wies,*** Amylase studies in dogs sera. Proc. Soc. Exp. Biol., **27,** 407 (1930). — 189) ***Dies.,*** Infl. of lig. of pancr. ducts . . . upon serum amyl. Jl. of Exp. Med., **55,** 505 (1932). — 190) ***J. M. Mc Caughan,*** Estim. of amyl. of the blood in pancr. dis. Surg., **59,** 598 (1934); BPh **83,** 567. — 191) ***J. C. Brill,*** Diast. act. of blood etc. Arch. of int. Med., **34,** 542 (1924); BPh **30,** 283. — 192) ***E. Reid c.s.,*** Blood and tissue diastases etc. Jl. of Biol. Chem., **99,** 615 (1933). — 193) ***J. Markowitz, H.B. Hough,*** Blood diast. in depancr. dogs. Amer. Jl. Phys., **75,** 571 (1926).

soll, daß das Pankreas als endokrines Organ den KH-Stoffwechsel mit regulirt. Und wenn wir andererseits wissen, daß Insulin und Adrenalin den amylatischen Apparat der Leber beeinflussen, so ist wieder vorerst nicht einzusehen, was die „Menge" an Am. im Blut damit zu tun hat; denn diese Hormone beeinflussen sicherlich nur den Aktivitätsgrad der Am. in der Leber (§ 410), nicht aber ihre „Menge" und nicht ihre Abgabe ins Blut. Es ist also ebenso unsicher, die Am. des Blutes mit der Leberfunktion in engen Zusammenhang zu bringen wie mit der Pankreasfunktion. Wir kommen auf die Frage der Bedeutung der Organamylasen nochmal im Zusammenhang § 410 zurück; hier sei nur ohne nochmalige Einzelkritik das z. T. kontroverse Material zusammengestellt.

Beim **Diabetes** lauten die Angaben wie schon früher (H.W. S. 734) verschieden; im übrigen habe ich sie zweifellos nicht sämtlich erfassen können, was kein großer Verlust ist; weitere parallele Angaben s. b. Harn § 308. Eine Erhöhung fanden DE TULLIO **195)** (meist), REID **196)** Eine Verminderung gibt BETTONI **197)** an, ebenso in der Regel SOTGIU **198)** und OTTENSTEIN **199)**; auffallend niedrige Werte KATSCH **200)**, der jedoch auch selten, z. B. im Koma, sehr hohe Werte fand. Die Erniedrigung scheint mit dem Glykogenmangel verknüpft zu sein.

Insulininjektionen wurden ebenfalls verschieden wirksam befunden; im allgemeinen reciprok zu den Befunden beim Diabetes insofern, als sie je nach dem Ergebnis des Autors die Wirkung des Diabetes beseitigen sollen.

Keine Einwirkung beim Diabetiker DE TULLIO **195)**; ebenso beim pankreopriven Hund (MARKOWITZ **193)**. Vermehrung beim Diabetiker BETTONI **197)**, SOTGIU **198)**; bei pancreopriven Hunden REID **192)**. Verminderung beim gut gefütterten Hund REID **201)**, bei Diabetikern REID **196)**, sowie beim Kaninchen, dagegen starke Steigerung im Krampfstadium. Bei Schwangeren unbestimmte Verminderung GOLDSCHMIDT-FÜRSTNER (l. c. 179).

Bei experimenteller Hyperglykaemie (vgl. l. c. 178) keine Veränderung (Glucosebelastung, Piqûre), nur nach Adrenalin leichte Senkung; Exstirpation der Nebennieren starke Erhöhung (GAYDA **202/3)**). Eine Erklärung wird darin gesucht, daß Adrenalin die Abgabe seitens der Organe hemmen soll; auch LOPATIN (l. c. 142) gibt Erhöhung nach Nebennierenentfernung an, GOLDSCHMIDT-FÜRSTNER Abnahme sowohl bei Zuckerbelastung wie Adrenalin, analog OBRAZCOV **205)** nach Piqûre. Bei hypophysärem Diabetes sehr hohe Werte (BETTONI **197)**); analog bei Zwergwuchs und Akromegalie WAKEFIELD (l. c. 232).

Thyroxin-injectionen senken auf $^1/_3$ (SCOZ **206)**; ebenso aber seltsamerweise Entfernung der Thyreoidea im gleichen Maße wie alle anderen Blutfermente (GAYDA **204)**). GARGASOLE **207)** konnte specifische Änderungen weder bei Zufuhr von allerlei Hormonen noch bei Exstirpationen der Thyreoidea, Nebennieren, Keimdrüsen auffinden; auch LOPATIN hat diese mit Ausnahme der Nebennieren vermißt.

---

195) ***R. de Tullio,*** Diastasi e ricambio d. idrati di carb. Fol. Med. (Napoli), **14,** 1764 (1928); BPh **50,** 758. — 196) ***G. Reid,*** Eff. of insulin on the blood-diast. Jl. of Biol. Chem., **97,** L (1932), **99,** 607 (1933). — 197) ***J. Bettoni,*** Correl. tra la secr. esterna e int. del pancr. nel diab. mell. Arch. di Pat., **10,** 615 (1931); BPh **64,** 313. — 198 ***G. Sotgiu, C. d'Ignazio,*** Pot. amilol. del sangue etc. nel diab. mell. etc. Arch. di Fisiopat., **2,** 45 (1934); BPh **80,** 260. — 199) ***B. Ottenstein,*** Gehalt der Haut und des Blutes an diast. F. Bioch. Zs., **240,** 350 (1931). — 200) ***G. Katsch,*** Diast. im Blut. Münch. Med. Ws. **1934,** I, 505 (Lit.). — 201) ***Ch. Reid, B. Narayana,*** Blood diast. Quart. Jl. exp. Phys., **20,** 305 (1930). — 202) ***T. Gayda,*** Infl. dell' iperglicemia sul pot. amilol. d. . . . sangue. Arch. di Sci. Biol., **15,** 147 (1930). S.A. — 203) ***Ders.,*** Infl. dell' asportaz. d. caps. surrenali sul pot. amilol. d. . . . sangue. ebd., **15,** 162 (1930). S.A. — 204) ***Ders.,*** Infl. della tiroidectomia sul. pot. amilol. del . . . sangue. ebd., **17,** 206 (1932). S.A. — 205) ***G. Obrazcov c.s.,*** Intermed. Stoffw. beim Zuckerstich. Russk. Fiziol. Ž., **14,** 219 (1931); BPh **68,** 290. — 206) ***G. Scoz,*** Pot. amilol. del plasma dei cani tratt. con tirox. Boll. Soc. Ital. Biol., **9,** 439 (1934); BPh **83,** 586. — 207) ***D. Gargasole,*** Infl. endocrine sull amil. del siero. Rass. Ter. Pat. **4,** 725 (1932); BPh **72,** 728.

Acetylcholin steigert stark; bei Verhinderung seiner Zersetzung durch gleichzeitige Einspritzung von Physostigmin (§ 280a) bis auf das 13fache; Atropin verhindert diese Wirkung (ANTOPOL 208)) (Gegensatz Acetylcholin—Atropin auch bei Muskelam., l. c. 155).

Aus den gleichen Gedankengängen heraus hat man sich auch mit den **Wirkungen eingeführter Diastase** beschäftigt. Daß injicirte Am. durch die Nieren in den Harn übergeht, wird § 308 näher beleuchtet werden; hier handelt es sich darum, daß sie vorher Wirkungen im Körper entfalten soll, nämlich auf den Blutzucker, wobei man sich nur wie üblich darüber nicht einig ist, ob sie ihn vermehrt oder herabsetzt. Theoretisch wäre das erstere wahrscheinlicher: im Blut befindliche zusätzliche Amylase kann in der Leber Glykogen abbauen, so bei ihrer Anstauung nach Unterbindung der Pankreasgänge (WOHLGEMUTH, *l. c. 744*); es ist aber unwahrscheinlich, daß künstlich zugeführte Am. als solche dieselben resp. überhaupt irgend welche sicheren Wirkungen entfaltet.

Es kann sich nur um parenteral zugeführte Am. handeln, da sie vom Darmlumen aus nicht ins Blut übergeht; im Gegensatz zu *l. c. 665* fand ZUCKER (l. c. 187) daß aus duodenal eingeführtem Speichel kein Enzym resorbirt wird. Auch dann tritt keine Am. über, wenn man nach HENNING 209) das Pankreas durch Secretin oder Histamin zu stärkerer Secretion anregt, oder wenn eine Hypersecretion an sich besteht und die Faeces sehr reichlich Am. enthalten (SOTGIU 198)). Bei pancreaslosen Hunden hat ZUMMO (l. c. 186) keine enterale Resorption gefunden. Nach MURATA 210) und TERASHIMA 211) ist Am. nur dann im Blut wiederzufinden, wenn man sie intravenös, nicht subcutan oder intraperitoneal einführt (vgl. *l. c. 657*).

Was nun die Wirkung auf den Blutzucker anlangt, so ist eine von ROSENFELD 212) gefundene Abnahme von WILSON 213) auf gleichgiltige Nebenstoffe zurückgeführt worden; wenn die Präparate so wirken, tun sie es auch nach Erhitzen. Indessen wird die Behauptung der Abnahme wiederholt von OTTENSTEIN 214) und SCHNEIDER 215), die sie sogar bei percutaner Einführung fanden, gleichzeitig mit einer Zunahme der Am. im Blute; es soll sich um eine „Reizung des Pankreas" handeln. Bei Diabetikern nach OTTENSTEIN erst Steigerung, dann Senkung. — Dagegen gibt WEINMANN 216) bei parenteraler Einführung (Kaninchen) Steigerung an; SOTGIU 217) mit Speichel erst geringe Zunahme, dann geringe Abnahme, mit käuflicher Diastase ganz verschiedene Erfolge bis zu tötlicher Hypoglykämie. Alle diese Vergiftungserscheinungen haben wohl sicher mit dem Ferment Am. nichts zu tun.

Wirkung eingeführter Stärke. Ebenso unsicher sind die Angaben über Veränderungen nach Injection von Stärke. ABDERHALDEN hatte nach parenteraler Einführung einen Anstieg gefunden, KING nicht (H.W. S. 732). Wahrscheinlich gibt es hier gar keine feste Regel, wie dies auch MAGARAM 218) angibt, der regellose Schwankungen mit wie ohne Stärkeinjectionen fand. Es gibt also kein „Abwehrferment".

BONGIORNO 219) fand bei kleinen Mengen Stärke (1 g) oder Glykogen leichte Vermehrung, bei größeren (3 g) Verminderung. GARGASOLE (l. c. 184) gibt umgekehrt an, daß intravenöse Gaben bis 0,8 g lösliche Stärke nichts ändern, größere einen Anstieg von 100 % herbeiführen. Indirekt ließ sich nur feststellen, daß eingeführte Stärke, weniger Glykogen, z. T. als solche, z. T. als Zucker ausgeschieden werden und auch Hyperglykämie auftritt, während der

---

208) ***W. Antopol c.s.,*** Blood amylase response to acetylcholine etc. Proc. Soc. Exp. Biol., **32**, 383 (1934); BPh **85**, 410. — 209) ***N. Henning, E. Bach,*** Resorpt. diastat. F. im menschl. Darm. D. Arch. Klin. Med., **168**, 374 (1930). — 210) ***M. Murata,*** Parenterale Resorpt. von Kolloiden III. Bioch. Zs., **226**, 457 (1930). — 211) ***Sh. Terashima,*** Überg. der ent. und parent. eingef. F. etc. Proc. Imp. Ac. Tokyo, **6**, 181 (1930). — 212) ***G. Rosenfeld,*** Abbau der Kohlenhydrate. Bioch. Zs., **222**, 457 (1930). — 213) ***H. E. Ch. Wilson, F. Strieck,*** Einfl. intraven. Inj. von Diast. etc. ebd., **251**, 199 (1932). — 214) ***B. Ottenstein,*** Diast. und Haut. Klin. Ws. **1931**, I, 1114. — 215) ***E. Schneider, W. Zahn,*** Diastasespiegel im Blut etc. Arch. für Klin. Chir., **169**, 306 (1932). — 216) ***J. Weinmann,*** Blutzuckersteig. durch Diast. Bioch. Zs., **273**, 312 (1934). — 217) ***G. Sotgiu, C. Calabrese,*** Az. d. diast. injett. etc. Giorn. Clin. Med., **15**, 928 (1934); BPh **83**, 88. — 218) ***M. Magaram, W. Engelhardt,*** Einfl. von Stärkeinjekt. auf die Blutamyl. Bioch. Zs., **182**, 215 (1927). — 219) ***A. C. Bongiorno,*** Var. d. amil. serica etc. Boll. Soc. Ital. Biol., **2**, 692; BPh **44**, 248.

pancreaslose Hund das ganze Glykogen wieder als solches oder als Zucker ausschneidet. Natürlich ist damit nicht gesagt, daß die Polyosen nun durch Blutam. gespalten werden (LOMBROSO **220**), SUNZERI **221**)).

Toxische Wirkungen. Phosphorvergiftung Ansteigen, Hund > Kaninchen (v. FALKENHAUSEN l. c. 128).

Nach ZUCKER (l. c. 187) soll die Am. bei Aethernarkose vorübergehend verschwinden, bei Chloroform stark herabgesetzt sein. Wie üblich, findet CASTRO **222**) das Gegenteil: alle Arten von Anaesthesie erhöhen die amylatische Wirkung, am wenigsten die Gasnarkosen (Aethylen, N_2O), am meisten Aethernarkose und Lumbalanaesthesie. Diese letztere Annahme wurde dazu passen, daß Narcotica die Leberamylase „lockern" (§ 410).

Blutamylase bei Pankreaserkrankungen. Von allen Studien über die Änderungen der amylatischen Wirkung des Blutes — und wie hier gleich gesagt sein soll, des Harnes, vgl. § 308 — scheint nur die Messung bei Pankreaserkrankungen eine exakte Basis darin zu haben, daß bei pathologischen Veränderungen dieser Drüse amylasehaltiges Sekret nicht wie normal durch den Darm abgeführt wird, sondern direkt von der Drüse aus in die Blutbahn übergeht. Eine Rückresorption von einmal in den Darm gelangtem Ferment scheint nicht stattzufinden (l. c. 187, 209).

Auch bei Parotitis kommen nach POPPER **223**) aus analogen Gründen bisweilen mäßige Steigerungen vor (D nach WOHLGEMUTH bis 64). — Auch bei experimenteller Pankreatitis (Hund) Erhöhung bis auf das zehnfache (SOTGIU **224**)); ebenso MC. CAUGHAN (l. c. 190), CLASEN **225**), BRANISTEANU **226**).

Altere klinische Lit. bei BLOCK (*l. c. 684, 685*). JANKER **227**) fand bei jeder sicheren Erkrankung des P. wesentliche Steigerungen in Blut und Harn, im Blut besonders deutlich bei gleichzeitiger Nierenschädigung. Größte Steigerung bei akuter Pankreatitis (POPPER **228/9**)). ELMAN **230**) bestätigt Erhöhung bei entzündlichen Prozessen und Cysten, fand sehr niedrigen Gehalt bei atrophirendem Carcinom. — Magenresektionen erhöhen nur dann, wenn das Ulcus in das P. penetrirt war, das somit verletzt werden mußte (**228**). Erhöhung bei akuten, Schwankungen nach beiden Seiten bei chronischen Erkrankungen und Tumoren; normale Werte mit einem Ausnahmefall (Carcinom) nur bei normalem P. (ELMAN **230/231**)). — Bei Carcinom nicht (POPPER), resp. nur in 6 von 20 Fällen erhöht (WAKEFIELD **232**)). BRINCK **233**) hohe Werte bei Magen- und Gallenerkrankungen nur bei Beteiligung des P. (sicherer als Harn), niedrige bei Cirrhosis und Diabetes. Nach KATSCH (l. c. 200) ist die Diastasebestimmung nach OTTENSTEIN ein wesentlicher Fortschritt in der Pankreas-Diagnostik.

Blutamylase bei sonstigen Erkrankungen. Am ehesten scheinen noch Lebererkrankungen Veränderungen hervorzurufen, jedoch nicht mit Sicherheit, außer natürlich, wenn das Pankreas mit betroffen ist, was sehr häufig der Fall ist (BRINCK **233**)).

---

220) ***U. Lombroso***, Dest. del glicogeno iniett. in circolo di cani etc. Boll. Soc. Ital. Biol., **2**, 330 (1927); BPh **43**, 65. — 221) ***G. Sunzeri***, Iniez. di amido in circolo. ebd., **2**, 339 (1927); BPh **43**, 65. — 222) ***Tr. Castro***, Diast. nel sangue . . . dopo anest. chir. Arch. di Ist. Bioch. ital., **4**, 361 (1932); BPh **72**, 181. — 223) ***H. L. Popper, A. Selinger***, Diastasebest. im Serum. Wiener klin. Ws., **41**, 199 (1928). — 224) ***G. Sotgiu***, Diast. nella pancr. acuta sperim. Fisiol. e Med., **3**, 525 (1932); BPh **71**, 233. — 225) ***A. C. Clasen c.s.***, Blood amyl. in exp. pancr. Surg. **59**, 756 (1934); BPh **85**, 96. — 226) ***D. Branisteanu, A. Boutroux***, Amyl. urin. dans divers cas norm. et path. Arch. Mal. App. dig., **23**, 746 (1933); BPh **75**, 184. — 227) ***R. Janker***, Diast. im Blut und Urin bei Pankr.-Erkr. Münch. Med. Ws., **74**, 101 (1927). — 228) ***H. L. Popper***, Diast.-Werte im Blut nach Magenresect. D. Zs. Chir., **221**, 273 (1929). — 229) ***Ders.***, Diast.-Best. bei Pancreatitis. D. Med. Ws. **1929**, II, 1712. — 230) ***R. Elman***, Blood amyl. in pancr. diseases. Proc. Soc. Exp. Biol., **25**, 173 (1927). — 231) ***R. Elman c.s.***, Blood amyl. estim. in. pancr. disease. Arch. of Surg., **19**, 943 (1929); Arch. of int. Med. **48**, 828 (1931). — 232) ***E. G. Wakefield c.s.***, Amyl. in the blood in pancr. dis. Arch. of int. Med., **45**, 473 (1930). — 233) ***J. Brinck, Rodriguez-Olleros***, Diast.-Spiegel im Blut. D. Arch. klin. Med., **175**, 691 (1933).

INTROZZI 234) gibt an, daß bei den verschiedensten Krankheiten im Allgemeinen die Richtung der Blut-Am. der der Schwankungen der Speichelam. parallel läuft.

POPPER c. s. 223) fanden meist keine Änderung, aber bisweilen bei reiner Cholelithiasis enorm hohe Blutwerte, auch bei Cholecystitis; desgl. BERNHARD 235) bei schweren Anfällen, nur selten bei leichten; desgl. KATSCH (l. c. 200) bei Cholecystitis in $^2/_3$ der Fälle, bei Leberatrophie Verminderung. — Bei Leberschädigungen in 75 % der Fälle Erhöhung (CRANDALL 236)).

Nach Injection von Hepatoxin bei Kaninchen leichte Zunahme, dann über Absinken in 8 Wochen wieder normal. Röntgenbestrahlung kleine Dosen Zunahme, große Dosen Abnahme (KAMEO 237)). — Bei Glykogenspeicherkrankheit starke Erhöhung HERTZ (l. c. 137).

Bei multipler Sclerose in ca. 50 % Erhöhung (CRANDALL 236)). Verminderung bei einigen Hautkrankheiten OTTENSTEIN (l. c. 199)), sowie ROST und OTTENSTEIN 238) besonders bei solchen, bei denen auch die Blutzuckerverhältnisse abnorm sind, z. B. bei der häufig mit Diabetes kombinirten Dermatitis intertriginosa.

Bei 4 Fällen von Lungentumoren Erhöhung (KATSCH, l. c. 200).

Infektionskrankheiten zeigen Erhöhungen, so BANG-Infektionen (KATSCH, l. c. 200); der Weg scheint über Affektion des Pankreas zu gehen. Künstliche Infektion (Kulturen von Dysenterie, Streptococcen) keine Änderung; Di-Toxin und schwächer Di-Kulturen starke Erhöhung (239). Bei 28 verschiedenen Infectionskrankheiten in 115 Fällen fand GERMER 240) in 40 % Erhöhungen, sonst normale Werte, bei Harn in 73 % erhöht.

Lymphen und Transsudate. Daß die Lymphbahn der Weg ist, auf dem die nach Gangunterbindung, Pankreasnekrosen etc. resorbirte Am. aus dem Pankreas ins Blut gelangt, ist H.W. S. 734 angegeben. Neuere Befunde dazu habe ich nicht aufgefunden. Nach TERASHIMA (l. c. 211) nimmt die Lymphe auch Am. nach peritonealer Injection von Diastase auf, die aber nicht ins Blut übergeht, sondern eben nur in der Lymphe nachweisbar ist, im Gegensatz zur Lipase.

In den Liquor cerebrospinalis gehen aus dem Blut intra vitam nur sehr geringe Mengen Am. über; sie findet sich nach COHEN 241) nur selten; in 2 von 31 Fällen, und auch dann sehr wenig, unter 1 Einheit; etwa 7 h nach dem Tode enthält der L. cer. in 20 % der Fälle deutlich Am. KASAHARA 242) fand dagegen regelmäßig Am., aber sehr geringe Mengen, in WOHLGEMUTH-Einheiten D = 0,3—0,7 (Kaninchen); Unterbindung der Pankreasgänge steigert vorübergehend. Mit Methode OTTENSTEIN fanden sich sehr wechselnde Werte (244): 10—40 mg-% Glucose, bei Erkrankungen des ZNS häufig mehr, bei Lues — im Gegensatz zum Blut — konstant sehr niedrige Werte, < 10 mg %; IMBER 244) konnte keinen Unterschied zwischen luischen und nicht-luischen Liquores bei Psychosen finden. — Bei Polyomyelitis erhöhte Werte unabhängig vom Gehalt an Zellen (ECKARDT 245)).

---

234) ***P. Introzzi, A. Mariani,*** Pot. amilol. d. saliva e siero etc. Clin. Med. Ital., **66,** 403 (1935); BPh **88,** 428. — 235) ***Fr. Bernhard,*** Lipasebest. in . . . akuten Pankreaserkr. dem Diast.-Nachweis überlegen? Klin. Ws. **1933,** I, 221. — 236) ***L. A. Crandall Jr., I. S. Cherry,*** Blood diast. in mult. sclerosis. Arch. of Neur., **27,** 367 (1932); BPh **67,** 108. — 237) ***T. Kameo,*** Einfl. von Leberschäd. auf Serumamyl. Fukuoka Jkw. Zasshi (jap.), **25** (1932); BPh **67, 677.** — 238) ***G. A. Rost, B. Ottenstein,*** Diast.-Best. im Blut bei Hautkrkh. Arch. für Derm., **167,** 602 (1933). — 239) ***M. Magaram,*** Blutamyl. bei künstl. Infect. Ž. eksp. Biol. (russ.), **11,** 142 (1929); BPh **52,** 658. — 240) ***K. Germer,*** Diast. im Blut u. Urin bei akuten Infect.-Krkh. Bibl. Laeger (dänisch), **123,** 405 (1931); BPh **66,** 128. — 241) ***I. Cohen,*** Occ. of diast. in the cerebrosp. fluid. Biochem. Jl., **19,** 290 (1925). — 242) ***M. Kasahara, Sh. Takaishi,*** Diast. F. im Liquor etc. Zs. exp. Med., **74,** 702 (1930). — 243) ***A. Marchionini, B. Ottenstein,*** Diast. des Liqu. cer. Klin. Ws., **1932,** II, 1345. — 244) ***I. Imber,*** Valore amilol. del liquor etc. Riv. di Freniatria, **58,** 287 (1934); BPh **85,** 128. — 245) ***Fr. Eckardt,*** Diast. im Liqu. cer. bei Poliomyel. Jb. Kind., **142,** 303 (1934).

Kammerwasser des Auges: Beeinflussung der Am. durch Pharmaka POPPER **246)**. Eserin erhöht, Adrenalin vermindert, was als Auflockerung bzw. Abdichtung der Blut-Kammerwasser-Schranke gedeutet wird. Histamin erhöht schwach das erste, beeinflußt nicht das 2. Kammerwasser. Pilocarpin, Pituitrin, Salyrgan wirken garnicht, letzteres bisweilen erhöhend. **Tränen** enthalten Am., ob aus den Drüsen oder aus dem Blut stammend, nicht festgestellt (FORTI **247)**).

Cystenflüssigkeit des Ovarium: nach TACHIBANA **248)** regelmäßig Am., pseudomucinöse viel mehr als seröse (D = 80 resp. 32).

8) Amylase in anderen Sekreten; Harn.

§ 408. Im Magensaft der Carnivoren und Omnivoren kommt Am. nicht vor, wohl aber natürlich im Mageninhalt bei Anacidität durch verschluckten Speichel. Neue Angaben dazu nicht zu berichten, ebensowenig ist die H.W. S. 735 berührte Frage geklärt, ob die Cardia-Drüsen der Herbivoren Am. produciren.

Kropf und Kaumagen der Vögel. Im H.W. wurde berichtet, daß die im Kropf vorgefundene Am. dort nicht gebildet wird, sondern aus der Nahrung stammt (*l. c. 503*). Dies hat MANGOLD **249)** wieder bestätigt. DULZETTO **249a)** und BERNARDI **250)** aber geben an, daß sie im Kropf gebildet wird, ebenso auch von der Schleimhaut des Kaumagens der Hühner, während MANGOLD den hier vorhandenen geringen Stärkeabbau auf zurückgetretene Darmamylase bezieht. Bei der Schleimhaut handelt es sich wohl sicher um das überall vorhandene Zellferment, das aber nicht zu Verdauungszwecken abgegeben wird, wie dies auch bei Säugetieren beobachtet ist (H.W. S. 735).

Galle. Gehalt an Am. sehr ungleichmäßig, bisweilen ganz fehlend. Beim Hund stets fehlend (FISCHLER **251)**). Reichlich in der Blasengalle der Schafe (LÖHNER **252)**). Beim Rinde läßt sich aus anatomischen Gründen (getrennte Mündung von Gallengang und Pankreasgang) die Rückstauung von Pankreas-saft in die Gallenblase ausschließen; hier ist sicher die Am. der Galle autochthon; sie findet sich schon in der Lebergalle, keine weitere Bildung in der Gallenblase (FOSSEL **253)**).

Milch. Methodisches (Jodreaktion) KLUGE **254)**, WEINSTEIN **255)**. CHRZASZCZ **256)** hat endgiltig erwiesen, daß die Milcham. nicht von Bakterien stammt. Er fand am meisten Am. im Rahm (adsorbirt an die Fettkügelchen, vgl. § 384). Bei Trockennahrung weniger als bei Grünfutter. Verschiedene Milchen absteigend Schaf, Stute, Kuh, Ziege.

HEISERER **257)** bestätigt den Einfluß der Nahrung, findet (Kuhmilch) starke Schwankungen auch bei gesunden Tieren, Trächtigkeit ohne Einfluß, hohe Werte z. B. vor dem Trocken-

---

246) ***H. Popper, J. Böck,*** Ferm.-Best. im Kammerwasser des Auges. Zs. exp. Med., **90,** 596 (1933). — 247) ***C. Forti,*** Pot. amilol. delle lacrime. Boll. Soc. Ital. Biol., **2,** 145 (1927); BPh **43,** 356. — 248) ***T. Tachibana,*** Ferm. in the cyst-fluid etc. I. Amylase. Jap. Jl. Obstet., **10,** 13 (1927); BPh **42,** 707. — 249) ***E. Mangold,*** KH- und Eiweißverdau. bei Tauben etc. Bioch. Zs., **156,** 3 (1925). — 249a) ***F. Dulzetto,*** Funz. d. ghiand. del gozzo etc. Arch. di Sci. biol., **14,** 431 (1930); BPh **56,** 482. — 250) ***A. Bernardi, M. A. Schwarz,*** Ursprung der Amylase im Kaumagen etc. Bioch. Zs., **253,** 383 (1932). — 251) ***F. Fischler,*** Physiol. der Leber. 2. Aufl. Berlin 1925, SS. 184, 250, cit.n. 252. — 252) ***L. Löhner,*** Gallen-Amylase. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **223,** 436 (1929). — 253) ***M. Fossel,*** Herkunft der Gallen-amyl. ebd., **228,** 764 (1931). — 254) ***H. Kluge,*** Milchdiastase. Zs. Unt. Lebensmittel **65,** 71 (1933). — 255) ***P. Weinstein,*** Amylasenachweis in der Milch. Zs. Unt. Lebensmittel, **68,** 73 (1934). — 256) ***T. Chrzaszcz, C. Goralówna,*** Milchdiastase. Bioch. Zs., **166,** 172 (1925), **180,** 247, 263 (1927). — 257) ***G. Heiserer,*** Amylasegehalt der Kuhmilch. Arch. für Hyg., **97,** 195 (1926).

stehen. SCHENK 258) hat in Ziegenmilch Am. vermißt; sehr hohe Werte bei Hund, Schwein, weniger Katze, *Cavia*; sehr wenig Kuh, Stute; bei allen nach dem Wurf am höchsten, dann abnehmend, bei Stuten nach 3 Monaten verschwunden. Beim Pasteurisiren 78 % zerstört; 47° ½ h wirkt wenig (KLUGE). Formaldehyd schädigt (WEINSTEIN). Opt. ph 6,44 (HEISERER) bis 6.9 (KLUGE); CHRZASZCZ hatte etwas geringere Werte, um 6 herum, gefunden.

Colostrum reich an Am. (CHRZASZCZ, HEISERER). Bei Erkrankungen des Euters und Maul- und Klauenseuche vermehrt, um so mehr, je schwerer die Störung (CHRZASZCZ).

Frauenmilch: Nach KASANSKAJA **259)** in 72 Milchen D = 330 — 5000, bei gesunden reichlich Milch gebenden Frauen hohe Werte, bei kranken oder angestrengten Frauen kleinere. Erstaunlich ist die „Neu-Entdeckung" der Am. in der Frauenmilch durch SCHLACK (1931!) **260)**, der hohe Werte fand, und zwar für „Verflüssigung" von Stärkekleister.

Eier. Im Hühnerei nach 12 h Bebrütung reichlich Am.; nach 24 h stark vermindert (TATEISHI **261)**; im Eigelb doppelt so viel wie im Eiweiß (ROTINI **262)**).

Harn. Die Harnamylase ist zu klinisch-diagnostischen Zwecken noch häufiger untersucht worden als die Blutamylase. Über die kritische Einstellung zu allen älteren Arbeiten, deren Ergebnisse überwiegend ganz wertlos sind, s. H.W. S. 736.

Auch heute noch sind die meisten Arbeiten methodisch nicht einwandsfrei; insbesondere ist es, selbst wenn der ph einregulirt wird, beim Harn kaum möglich, den Einfluß der Elektrolyte zu normalisiren, die ja bei tierischen Am. wesentlich für die Wirkung sind. Immerhin sind die Fehler nicht so groß, daß man nicht festlegen kann, daß die Harnam. im Allgemeinen den Schwankungen der Blutam. folgt, und nur dann wesentlich andere Kurven zeigt, wenn auch die Nieren mit angegriffen sind. So zeigt sich denn auch hier, daß diagnostisch die Bestimmung der Harnam. nur bei akuten Pankreaserkrankungen mit einiger Sicherheit zu verwerten ist. Unter diesen allgemeinen Vorbehalten seien nun die neuen Einzelangaben kurz referirt. An erster Stelle muß eine mit aller modernen Exaktheit durchgeführte Arbeit von NØRBY **263)** erwähnt werden, die auf grund einwandfreier Methodik und reproducirbarer Bedingungen die Harnamylase zum ersten Mal genau beschrieben hat (Maltose-bestimmung nach HAGEDORN-JENSEN, besonders modificirt). Berechnung aus der monomolekularen Reaktionskonstante, die hier der Enzymmenge proportional ist. Die Harnam. ähnelt in ihren Bedingungen (Wärme, ph, Salze) sehr der Speichelam. (vgl. §§ 382, 385); jedoch scheint der Harn noch Stoffe von besonderem Einfluß zu enthalten, da sich die Stabilität bei sonst gleichen Bedingungen mit der Verdünnung ändert.

Zur Methodik sei noch erwähnt, daß HERZFELD **264)** an stelle der WOHLGEMUTH-Methode die Messung der Verdünnung setzen will, in der grade noch Osazon abgeschieden wird; dies entspricht 0,1—0,2 mg Zucker. — Modifikation seiner eigenen Methode WOHLGEMUTH **265)**; Notwendigkeit der Pufferung auf ph = 6,8 BAUMANN **266)**.

Herstellung eines sehr wirksamen Fermentpräparates aus Harn bei Pankreasnekrose durch lange Dialyse ROSTOCK **267)**; frei von Lipase und Trypsin, 30 mal wirksamer als Diastase-MERCK.

Normale Verhältnisse. Nach NØRBY ist beim Menschen bei gleicher Kost die 24-Stunden-Menge der Am. ziemlich konstant, unabhängig von dem ausgeschiedenen Quantum Flüssig-

---

258) ***R. Schenk,*** Amylasegeh. der Milch verschied. Tiere. Arch. Tierhk., **58,** 375 (1928); BPh **49,** 113. — 259) ***E. J. Kasanskaja,*** Amylasegehalt der Frauenmilch (Russ.); BPh **83,** 898. — 260) ***H. Schlack, W. Scharfnagel,*** Unbek. Eigensch. der Frauenmilch (Diastase) Mschr. Kinderhk., **51,** 273 (1931); BPh **65,** 534. — 261) ***Sh. Tateishi,*** Chemie der Bebrüt. von Hühnereiern (Amylase). Mitt. Med. Ak. Kyoto, **6,** 534 (1930); BPh **68,** 456. — 262) ***O. T. Rotini,*** Amil. dell'uova. Ann. Labor. Ric. Ferm. Spallanzani, **2,** 249 (1931). — 263) ***G. Nørby,*** Estim. and stabil. of urine-amylase. C. R. Lab. Carlsberg, **18,** H. 7 (1931). — 264) ***E. Herzfeld,*** Nachw. diast. Wirk. im Urin. Bioch. Zs., **242,** 251 (1931). — 265) ***J. Wohlgemuth,*** Diastase-Best. im Urin. Klin. Ws. **1929,** II, 1253. — 266) ***J. Baumann,*** Meth. der Best. der Pankr.-Diast. im Urin. Klin. Ws. **1929,** 982. — 267) ***P. Rostock,*** Diast.-Gewinn. aus menschl. Harn. Ferm.-F., **9,** 192 (1927).

keit. Dagegen sind die mit den einzelnen Mictionen ausgeschiedenen Mengen stark schwankend (COHEN **268)**), auch im Hunger; so daß eine direkte Beziehung mit der Nahrungsaufnahme nicht besteht; nach einer Fleischmahlzeit tritt ein Anstieg auf (COHEN l. c. 175). Nach MAYER **269)** (viscosim. Methode) sind aber auch die Schwankungen der Tagesmenge noch groß, der Amylasegehalt ist kein brauchbares Mittel zur Funktionsprüfung der Nieren. Nach FRICKER **270)** liegen die Grenzen bei Gesunden zwischen D = 10—100. Säuglinge fast stets < 10. Nach OKADA **271)** ist der Gehalt zunächst etwas höher und fällt bis zum 16. Tage ab. Bei älteren Kindern steigen dann die Werte an, nach der Methode ADAM D = 4—96 (ECKARDT **272)**); für jedes Lebensalter ziemlich konstant.

Bei Schwangerschaft normale (SCHMIDT **273)**) oder hohe Werte innerhalb der Norm (D = 100), selten darüber (FRICKER), dagegen gibt DI CANDIA **274)** starkes Ansteigen gegen Ende der Schw. bis zur Geburt an. Auch bei Kreißenden normale Werte (SCHMIDT **273)**), bei schweren Geburten nach DI CANDIA **247)** sehr hohe Werte (15fache der Norm), ebenso in pathologischen Puerperien. Allantois-flüssigkeit doppelt so viel wie im Säuglingsharn (OKADA).

Ausscheidung durch die Niere; eingeführte Am. (Pankreas, Speichel) geht vollständig in den Harn über, nicht in die Speicheldrüse (TOMASINO, l. c. 57); es sind also die Nieren an sich für Am. durchlässig, es werden auch Überschüsse aus dem Blut selbst in den Harn abgegeben. Aber nach LO MONACO **275)** tritt kein voller Ausgleich ein: bei verschiedenen Tieren geht der Gehalt beider Flüssigkeiten nicht parallel, wenn auch in gleicher Richtung. So findet er im Harn von Rind und Schwein etwa gleiche Mengen Am., im Blut bei Schwein viel mehr als Rind.

Wirkung von Giften. Nach PERRIN (l. c. 91) wirken sowohl Pilocarpin wie Atropin herabsetzend. Anaesthetica wirken steigernd (CASTRO l. c. 222), ebenso FOGED **276)**, der nach Operationen in 14 % hohe Werte fand. Schnelles Eintreten spricht für direkte Narkose-schädigung, späteres für Wundinfektion oder infectiöse Pancreatitis; auch TINOZZI **277)** nimmt bei Narkose eine Pankreasschädigung an, die bei Chloroform länger dauert als bei Äther.

Krankheiten. Wie eingangs erwähnt sind die beiden einzig sicheren Beziehungen die Verminderung bei Nierenstörungen und die Vermehrung bei akuten Pankreasaffektionen. Erhöhungen bei Nephritis beruhen auf Ausschwemmung von Zellen oder Zelltrümmern (SCHMEREL **278)**).

Bei Nephritis fand SCHMEREL **278)** mit sorgfältiger Methodik (Pufferung, NaCl-Aktivirung) Verminderung, ebenso ECKARDT (l. c. 272), bei Kindern. Auch D'IGNAZIO **279)** fand bei Nierenstörungen den Index Blut/Harn erhöht, ähnlich bei anderer Berechnung SCHAANNING **280)**. Auf die Verminderung der Nierenpassage will SCHMEREL auch die verringerte

---

268) ***I. Cohen,*** Concentr. of diast. in the urine etc. Biochem. Jl., **20,** 253 (1926). — 269) ***W. B. Mayer, H. Finkelstein,*** Amyl. conc. in normal urine. Bull. Hopkins Hosp., **45,** 105 (1929). — 270) ***E. Fricker,*** Harnamyl.-Geh. bei . . . Menschen. Schweiz. Med. Ws. **1926,** H. 6. S. A. — 271) ***K. Okada,*** Harnamyl. jap. Säugl. etc. Mitt. Med. Ak. Kyoto, **6,** 2705 (1932); BPh **72,** 728. — 272) ***Fr. Eckardt,*** Diast. im Säuglings- und Kinderharn. Jb. Kind., **142,** 319 (1934). — 273) ***W. Schmidt,*** Diastasebest. bei Schwangeren etc. Zbl. Gyn. **1928,** 2434. — 274) ***G. di Candia,*** Indice diastas. n. stato puerper. Atti Soc. Ital. Ost., **26,** 433 (1928); BPh **54,** 667. — 275) ***G. Lo Monaco, R. Micale,*** Amil. del siero . . . e dell'urina etc. Boll. Soc. ital. Biol., **2,** 215 (1927); BPh **43,** 99. — 276) ***J. Foged,*** Clin. signif. of diastasuria. Acta Chir. Scand., **69,** 451, 543 (1931); BPh **69,** 451. — 277) ***F. P. Tinozzi,*** Diast. nell'urina in . . . mal. Ann. ital. chir., **7,** 161 (1928); BPh **46,** 100. — 278) ***Fr. Schmerel,*** Vermind. Diastasewirk. des Harns bei Nierenkr. u. Diabetes. Bioch. Zs., **208,** 415 (1929). — 279) ***C. d'Ignazio, G. Sotgiu,*** Rapp. fra pot. diast. del sangue e dell'urina. Arch. di Fisiopat., **2,** 19 (1934); BPh **80,** 300. — 280) ***Chr. K. Schaanning,*** Diastase im Serum und Urin. Norsk. Mag. Läg., **88,** 612, 801 (1927); BPh **46,** 776.

Konz. beim Diabetes wenigstens teilweise zurückführen, die nach seinen Versuchen nicht nur auf Elektrolytmangel im verdünnten Diabetikerharn zu beziehen ist. Daneben kommt auch der verringerte Gehalt im Blut (§ 407) in Frage, aber auch nicht ausreichend. Auch ECKARDT (l. c. 272) fand bei kindlichem Diabetes Verminderung. — Bei Eklampsie meist Steigerung, während Blut meist normal (SCHMIDT, l. c. 273, SPITZER 281)).

Pankreasaffektionen. Daß bei akuten Pankreasschädigungen die Amylase, ebenso wie sie im Blut vermehrt ist, dann auch in den Harn übergeht, ist vielfach bestätigt. Die klinischen Diskussionen erstrecken sich meist nur noch auf Fragen, die für uns von minderem Range sind: welche Untersuchung, Blut oder Harn, diagnostisch besser verwertbar ist, ob auch andere Affektionen, besonders der Bauchorgane, analoge Erscheinungen mit sich bringen, wieweit die Reaktion für die Prognose und Therapie brauchbar ist u. dgl. Auch Erkrankungen der Parotis zeigen erhöhte Werte. Anbei die mir zu Gesicht gekommenen Einzelbefunde.

UNGER 282) fand in 29 von 31 Fällen von akuten Erkrankungen des P. erhöhte Werte; solche von D > 1000 sind prognostisch ungünstig; analoge Resultate, auch bei Parotitis SCHAANNING 280). Subakute niedrigere Werte (ROSTOCK 283); bei akuten Erkrankungen stets, aber auch bei anderen Baucherkrankungen (s. u.) SKOOG 284).

Parallel zur Schwere der Krankheit KRECH 285). Weitere Bestätigung GARRY (l. c. 187), BRANISTEANU (l. c. 226). ROST 286) fand brauchbare Werte nur bei Pufferung des Harns nach BAUMANN (l. c. 266). Kritische Einstellung HEGGE 287). Auch secundäre Funktionsstörungen des P. (Oedeme, Gangverschluß) führen zur Steigerung. (Ulcus, Gallenerkrank.); andererseits auch bei Pankreaserkr. bisweilen normale Werte; auch FRICKER (l. c. 270) fand meist normale Werte.

Auch bei anderen Erkrankungen der Bauchorgane erhöhte Werte (SCHAANNING 280), SKOOG 284)) besonders häufig bei Gallensteinen u. ae.; ROLOFF 288) fand aber in 30 Fallen normale Reaktion, wenn keine Affektion des P. vorlag (Operation oder Autopsie); bei sekundärer Affektion des P. erhöhte Werte (KACZANDER 289); s. a. die § 407 citirten Arbeiten, bes. POPPER c.s. (l. c. 223). Bei Achylien und Fäulnisdyspepsien niedrige Werte HERTEL 290).

Zehrende Krankheiten, Carcinom, chirurg. Tuberkulose, bewirken Abnahme (TINOZZI, l. c. 277); dagegen keine sicheren Beziehungen bei Carcinom FRÄNKEL 291); in einem Fall sehr tiefes Absinken (FRICKER, l. c. 270).

Bei Infektionskrankheiten (Kinder) Steigerung (ECKARDT, l. c. 272), ebenso GRUNKE 292), der sie mit Störungen der Funktion von Pankreas und Parotis in Beziehung bringt.

9) Amylasen der Wirbellosen.

§ 409. Soweit es sich um einfachen Nachweis des Enzyms bei Wirbellosen handelt, werden wir den Hauptteil der Angaben erst im Allg. Teil bringen können; denn die Arbeiten sind gewöhnlich auf den gesamten Enzym-apparat des betr. Tieres gerichtet und es lohnt sich nicht, sie bei jedem Ferment aufs Neue zu citiren, um so weniger grade hier, weil das Vorkommen der ubiquitären Amylase ja an sich

---

281) ***W. Spitzer,*** Diast. in ... Schwangersch. etc. Arch. für Gynäkol., **150,** 680 (1932). — 282) ***E. Unger, H. Heuss,*** Diagn. Wert der Diastase-Erhöh. im Urin etc. Zbl. Chir., **54,** 770 (1927). — 283) ***P. Rostock,*** Urindiast. bei der akuten Pankr.-Nekrose. Beitr. Klin. Chir., **143,** 330 (1928). — 284) ***T. Skoog,*** Diastase-Reaktion im Harn etc. Acta Chir. Skand., **65,** Suppl., 14 (1929); BPh **54,** 504. — 285) ***W. Krech,*** Harndiastase-probe. Beitr. Klin. Chir., **153,** 110 (1931). — 286) ***Rost,*** Diast.-Werte im Urin bei akuter Pankr.-Nekr. Münch. Med. Ws. **1933,** II, 1971. — 287) ***E. Hegge,*** Diastase und Blutzucker in der Pankr.-Diagn. Norsk. Mag. Läg., **91,** 182 (1930); BPh **56,** 70. — 288) ***W. Roloff,*** Diagn. der ... Pankr. Erkr. durch Diast.-Nachw. im Harn. D. med. Ws., **1927,** 1043. — 289) ***P. Kaczander,*** Diagn. der Pankr.-Aff. mittels Diast.-Probe etc. D. med. Ws., **1931,** I, 1103. — 290) ***H. Hertel,*** Urindiast. bei Erkr. des Magens. Diss. Leipzig 1931; BPh **65,** 243. — 291) ***E. Fränkel c.s.,*** Diastasegehalt etc. im Urin von Krebskranken. Bioch. Zs., **245,** 44 (1932). — 292) ***W. Grunke,*** Harndiastase bei akuten Infekt.-Krkh. Zs. klin. Med., **113,** 782 (1930).

eine Selbstverständlichkeit ist. So seien denn nur einige Arbeiten hier citirt. Allg. Lit. s. KRÜGER **293/5)**.

Eine allgemeinere Betrachtung über die Am. aus dem Darmsaft von Schnecken und Raupen liegt von ULLMANN **295)** vor. Sie können rohe Stärke — wie andere Am. auch — nicht angreifen, nur fein verteilte oder aufgekochte, dagegen wird Glykogen leicht gespalten, es scheint sich um eine α-Am. zu handeln; auch KRÜGER u. GRAETZ **296)** halten die Am. von *Astacus* für α, da sie α-Maltose bildet.

Bei Copepoden, *Calanus finmarchicus*, fand BOND **297)** eine Am. mit dem ph-Opt. von 7,2, bei 6,0 schon stark abfallend. — Bei der Polychaete *Sabella pavonina* stark wirksame Am. im Darm NICOL **298)**, ph-Opt. 6,8. — Muscheln: im Jecur von *Haliotus* OSHIMA **300)**; bei *Pecten maximus* im Kristallstylus GRAHAM **289)**; opt. ph. 6,5. Bei Cephalopoden fehlt Am. nach ROMIJN **301)** im Speichel, findet sich in der Mitteldarmdrüse. Mitteldarmdrüse von *Tethyum* (*Tunicata*); Abhäng. der opt. Temp. von der Versuchsdauer BERRILL **301a)**.

Am häufigsten sind die Arthropoden untersucht, und unter ihnen die Insekten, weil die Honigbildung der Bienen besonderes Interesse erweckt.

Bei dekapoden Crustaceen Am. in der Hämolymphe (DAMBOVICEANU **302)**); bei der Häutung auf das Zehnfache vermehrt. — Im Darm von *Astacus* Am. etwa in gleicher Menge wie Maltase, im Gegensatz zu den Wirbeltieren (VONK **303)**, WIERSMA **304)**); ph-Opt. nach WIERSMA = 5,6, während KRÜGER u. GRAETZ **296)** ca. 6,1 fanden, also gleich der Am. des Speichels; beide Angaben ohne maximale Salzaktivirung.

Bei *Bombyx mori L.* fand YAMAFUJI **305)** im Darm verschiedene Mengen bei verschiedenen Rassen; im Blut Zunahme im Hunger, sonst zwischen gut und schlecht gewachsenen Tieren kein Unterschied, ♀ > ♂, Maximum während des Einspinnens. MATSUMURA **306)** fand ungefähr das Gegenteil: ♂ > ♀, Herabsetzung durch Hunger, Kälte, Hitze etc. Die einzelnen Rassen haben einen erblich fixirten Gehalt (Darm und Blut); japanische > europäische. — Bei *Apis mellifica*, der Honigbiene, hat EVENIUS **307)** im Gegensatz zu anderen Annahmen (PHILLIPS) nachgewiesen, daß Am. tatsächlich in den Darm abgegeben wird, nicht nur im Gewebe vorkommt.

Bei *Empoasca Solana Delong*, einer Art der *Rhynchota, Homoptera*, fand HERFORD **308)** in der Speicheldrüse Am., die dort angeblich durch Einwirkung von Hefen gebildet wird; ferner Am. der Speicheldrüse bei *Periplaneta* und *Blattella* WIGGLESWORTH **309)**; sonst fehlt

---

293) ***P. Krüger***, Vergl. Fermentstoffw. der niederen Tiere. Erg. Phys., **35**, 538 (1933). S.A. — 294) ***Ders.*** Verdau. Drüsen niederer Tiere. — Verdau. bei Wirbellosen. Hb. der Bioch. Erg. W. Bd. II, 350, 415, Jena 1934. — 295) ***T. Ullmann***, Einw. der Ferm. ein. Wirbell. auf polymere KH. Zs. vergl. Phys., **17**, 520 (1932); BPh **70**, 658. — 296) ***P. Krüger, E. Graetz***, Ferm. des Flußkrebs-Magensaftes. Zool. Jb., **45**, 463 (1928). S.A. — 297) ***R. M. Bond***, Dig. enz. of the pelag. copepod Calanus. Biol. Bull., **67**, 461 (1934). — 298) ***E. A. T. Nicol***, Feed. mech. ..., phys. of dig. in Sabella pav. Trans. Roy. Soc. Edinb. **56**, 537 (1930), cit.n. 293. — 299) ***Al. Graham***, Style enz. of Pecten. Proc. Roy. Soc., **B**, **108**, 84 (1931). — 300) ***K. Oshima***, Enz. in den Eingeweiden vom Haliotus. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **7**, 17 (1932). — 301) ***C. Romijn***, Verdau. Enz. bei Cephalopoden. Acta brev. neerl. phys., **5**, 14 (1935). — 301a) ***N. J. Berrill***, Dig. in ascidians etc. Brit. Jl. exp. Biol., **6**, 275 (1929). — 302) ***A. Damboviceanu***, Liqu. cavit. chez les crust. décapodes. (Amylase). Arch. Roum. Path., **5**, 239 (1932); BPh **72**, 43. — 303) ***H. J. Vonk***, Verdau. Enz. von Astacus etc. Tijdschr. Ned. Dierkund. Ver. **1928**, H. 2. S.A. — 304) ***C. A. G. Wiersma, R. van der Ween***, Kohleh. Verdau. bei Astacus. Zs. vgl. Phys., **7**, 269 (1928). S.A. — 305) ***K. Yamafuji***, Enz. von Bombyx mori. Amylase des Blutes. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **8**, 156 (1932), **10**, 119 (1934). S.A. — 306) ***S. Matsumura***, Enz. act. of ... Bombyx mori. 11. Kongr. internat. Zool. Padova 1930, III, 1270 (1932), cit.n. 293. — 307) ***J. Evenius***, Stärkeverdau. im Darmkanal der Honigbiene. Arch. Bienenk., **8**, 199 (1927); BPh **44**, 631. — 308) ***G. V. Herford***, Aussch. von Diast.... durch Empoasca etc. Ann. appl. Biol. **22**, 301 (1935); Chem. Zbl. **1935**, II, 2076. — 309) ***V. B. Wigglesworth***, Dig. in the cockroach. Biochem. Jl., **21**, 797 (1927).

sie bei Insekten im Speichel meist (s. b. KRÜGER 294)). Das ph-Opt. ist bei 5,8, also etwas saurer als bei Wirbeltieren, es scheint dies durch einen thermostabilen Begleitstoff mit bedingt zu sein.

Amylase des Honigs. Methodisches (Nachweis der Am. zur Erprobung vorherigen Erhitzens) FIEHE **810)** (Vergleich der bekannten Methoden, Modification der GOTHE'schen Methode); Empfehlung der Methode nach KOCH (WEISHAAR **818)**). — Nach FIEHE **811/812)** stammt nur wenig der Honig-am. aus dem Darmsaft der Biene, der größte Teil aus den Pflanzen; je ärmer die Nahrung, desto ärmer der Honig, was besonders bei Zuckerfütterung hervortritt; (**812)** aber auch bei Rosmarin-Honigen fehlte Am. praktisch ganz. Dies wird auch dadurch bekräftigt, daß ROTINI **814)** die Honigam. gleich der des Malzes fand (ph = 5,3, Temp. Opt. 62°), aber nur für „Verflüssigung", bei der Zuckerbildung verhält sie sich ganz abweichend. — Auch LOTHROP **815)** gibt den opt. ph mit 5,3 an, findet ebenfalls Abhängigkeit von der Art der Blüten. (Dunkle > helle, am meisten *Fagopyrum* und *Ranunculus*, am wenigsten *Medicago sativa*, *Citrus*. — Nach VANSELL **816)** stammt die Am. aus dem Pollen. — WEISHAAR **818)** findet (mit der Methode KOCH) genau das Gegenteil: > 95 % der Am. stammen aus der Biene selbst, nur etwa 2 % aus der Blüte, 1 % aus dem Pollen.

10) Bedeutung der Organamylasen für den Kohlenhydrathaushalt*).

§ 410. Dieses Problem ist relativ einfach, wenn man den Haushalt der einzelnen Zellen resp. den Verbrauch der Organe aus ihren eigenen Beständen betrachtet. Es kann gar keinem Zweifel unterliegen, daß die Zellamylasen dazu bestimmt sind, jedenfalls den Abbau, wahrscheinlich aber auch den Aufbau des Glykogens zu katalysiren. Und da wir sicherlich keinen großen zahlenmäßigen Fehler machen, wenn wir annehmen, daß jede Zelle in der Norm ihren KH-Haushalt zunächst nur aus ihrem zelleigenen Glykogen deckt, und der zugeführte Blutzucker, Glucopyranose als „Transportform", zunächst erst in zelleigenes Glykogen umgebildet wird, so ist die Rolle der Zell-amylasen an sich im Abbau und wohl auch im Aufbau ganz klar und bereits im H.W. §§ 236, 237, 253 besprochen. Die einzige Frage dabei ist die bei allen Enzymen und allen Zellen immer wieder auftauchende nach der Regulation dieses inneren Betriebes, nach der Aktivirung und Passivirung der Zellfermente.

Diese Frage wächst sich aber nun zu einem Grundproblem des Allgemeinstoffwechsels aus, wenn wir nun die Rolle der Amylasen für die Versorgung eben der einzelnen Organzellen mit Zucker zum Zweck der zelleigenen Glykogenbildung betrachten wollen. Dann können wir wieder das Problem im wesentlichen auf die Leber beschränken, denn ob überhaupt andere Organe Glykogen für die Zwecke des Gesamtorganismus speichern, ist sehr fraglich; jedenfalls ist die Leber das weit überragende, wahrscheinlich das einzige Reservoir des normalen Zuckerhaushaltes. In der Norm braucht der Muskel wohl seine großen Glykogenreserven nur für seine eigenen Zwecke, für den Arbeitsstoffwechsel.

Die Verhältnisse sind sehr komplicirt und hier nicht eingehend zu behandeln. Nur Einiges sei angedeutet, weil der Antagonismus Adrenalin-Insulin auch für den

---

*) Darstellungen der hier zu behandelnden Probleme **817—819)**.

810) ***J. Fiehe, W. Kordatzki***, Honigdiastase. Zs. Unt. Lebensmittel, **55**, 162 (1928). — 811) ***J. Fiehe***, Herkunft der Honigdiastase. ebd., **63**, 329 (1932). — 312) ***Ders.***, Zuckerfütterungshonig. ebd., **55**, 169 (1928). — 313) ***H. Weishaar***, Best. etc. der Honigdiastase. Zs. Unt. Lebensm., **65**, 369 (1933) (Lit.). — 314) ***O. T. Rotini***, Amil. del miele. Ann. Labor. Ric. Spallanz., **2**, 211 (1931). S.A. — 315) ***R. E. Lothrop, H. S. Paine***, Diast. activ. of some amer. honeys. Ind. Eng. Chem., **23**, 71 (1931). — 316) ***G. H. Vansell***, Honey diast. etc. Report State Apiarist. Iowa **1930**, **57**, cit.n. 313. — 317) ***J. Kapfhammer***, Die Leber im Stoffwechsel. Hb. der Bioch. Erg. Werk Bd. III, Jena 1935. — 318) ***J. Kühnau***, Kohlenhydrate im Stoffw. ebd. — 319) ***J. Frhr. v. Ledebur***, Pankreas. ebd.

Abbau des Glykogens im Muskel gilt. Aber Muskel und Leber verhalten sich ganz verschieden. Erstens muß man nach WERTHEIMER **320)** damit rechnen, daß beim Muskel im Gegensatz zur Leber die Vorgänge am Glykogen noch unter besonderer Kontrolle durch das Nervensystem stehen. Enervirte Muskeln können weder durch Hunger oder durch Adrenalin zum Abbau, noch durch Mast zum Aufbau von Glykogen veranlaßt werden. Adrenalin greift also nicht den Muskel direkt an, wohl aber die Leber. Zweitens aber gibt der Muskel niemals Zucker ab. Sein starkes zymatisches System verwandelt die Abbauprodukte des Glykogens — die vielleicht garkeine Glucose enthalten, § 367 —, sofort in C_3-Körper, die stabilisirt also als Milchsäure erscheinen, während man bei Leber das verschwundene Glykogen als freien Zucker wiederfindet (z. B. MACLEOD, l. c. 145). Bei leberlosen Fröschen geht das gesamte unter Adrenalinwirkung abgebaute Glykogen als Milchsäure in den Harn über; kein Zucker im Harn (GEIGER **321)**). Unter besonderen Umständen kann nun diese aus dem Muskel ins Blut übergehende Milchsäure — etwa bei Überschuß infolge von Arbeit — von der Leber aufgefangen, zu Glykogen synthetisirt und so indirekt wieder dem KH-Stoffwechsel des Gesamtorganismus zugeführt werden; dies geschieht auch bei Adrenalinwirkung auf den Muskel (s. u.), wie CORI **322/3)** fand.

Aber diese Milchsäure wird eben total von der Leber aufgefangen, kommt nicht als Nährstoff an die Organzellen. Der Zucker des Blutes, die einzige Nährstoffquelle aller Organzellen, also das Material für die Versorgung des Gesamtkörpers stammt ausschließlich aus der Leber, wie MANN u. MAGATH gefunden haben und mehrfach bestätigt worden ist (z. B. SOSKIN **324)**).

Wenn wir also auch vorausschicken können, daß die Mechanismen der Aktivirung und Passivirung der Amylasen für alle Zellen etwa die gleichen Grundlagen haben, und wenn wir den wichtigsten dieser Mechanismen, das fein ausgeglichene Spiel zwischen Nebenniere und Pankreas, in wenig veränderter Form auch beim Muskel wiederfinden, so ist doch für unsere Frage, die Bedeutung der Organ-amylasen für den KH-Stoffwechsel und somit auch seine Anomalien, das Problem konzentrirt auf die Am. der Leber, auf die Aktivirung und Passivirung der Amylasen in diesem Centralorgan. Natürlich läßt sich die Experimentalforschung nicht darauf einengen: jede Arbeit, die speciell an der Leber ausgeführt wird, gibt automatisch Aufschlüsse auch für andere Zellarten, und umgekehrt wirken die eingehenden Untersuchungen am Muskel indirekt auch auf die Klarstellung der Probleme an der Leber zurück. So können wir auch hier nicht willkürlich trennen und müssen die Arbeiten am Muskel wenigstens ihrem hier interessirenden Hauptinhalt nach mit anführen.

Das Problem ist somit von zwei Seiten her eingeengt, wenn auch noch lange nicht im Einzelnen gelöst worden. Einerseits können wir heute mit Sicherheit aussagen, daß das Allgemeinproblem der Aktivirung und Passivirung von Zellfermenten ein Problem der Symplexbindung einerseits, der Elektrolytwirkung andererseits ist, was man dahin zusammenfassen kann, daß es ein kolloid-chemisches, genauer ein Oberflächenproblem ist. Speciell bei den Amylasen haben wir ja oft darauf hingewiesen, daß sowohl das Ferment (§§ 376, 384, 394) wie auch das Substrat

---

320) ***E, Wertheimer,*** Abhäng. der Muskelglyk.-Depots vom Nervensystem. Arch. ges. Phys. (PFLÜGER), **215**, 779, 796 (1927). — 321) ***E. Geiger,*** Mobilis. des Muskelglykog. durch Adrenalin etc. Bioch. Zs., **223**, 190 (1930). — 322) ***C. F. Cori, G. T. Cori,*** New concept. of the mech. of epinephrine glycosuria. Proc. Soc. Exp. Biol., **25**, 66 (1927); BPh **44**, 531. — 323) ***Dies.,*** Mech. of epinephrine act. Jl. of Biol. Chem., **79**, 309, 321, 343, **81**, 389 (1928/9). — 324) ***S. Soskin,*** Muscle glycogen as a source of blood sugar. Amer. Jl. Phys., **81**, 382 (1927).

(§ 372a) in verschiedenartigster Weise gebunden sein kann; einerseits zwar an sich aktiv, aber unbeweglich (Desmo-amylasen), andererseits inaktivirend gebunden. Es ist also kein Zweifel möglich, daß der Großteil der Regulirungen des Fermentgetriebes auf dispersoidchemischen Beeinflussungen dieser Symplexbindungen beruht; dann bleibt immer noch zu untersuchen, ob im Einzelfall die Bindung des Substrats oder des Enzyms wichtiger ist.

Dies haben wir im Prinzip — ohne diese ganz generelle Schlußfolgerung zu ziehen — bereits im H.W. S. 738 vor Allem in Anschluß an die Ansichten von Lesser berichtet, und sind dort bereits auf den Hormon-antagonismus gestoßen, der wie es scheint ganz wesentlich bestimmend für die auf diesem Wege verlaufenden Regulationen des amylatischen Abbaus ist. Bei diesem Antagonismus stehen sich Nebenniere und Pankreas hauptsächlich gegenüber, aber — wie stets — spielen auch andere endokrine Organe mit. Dem hormonalen Antagonismus übergeordnet ist ein nervöser, der die Abgabe dieser Hormone regulirt, der Sympathicus das Adrenalin, der Parasympathicus das Insulin, und darüber wieder herrschen Großhirncentren, wahrscheinlich im Pons (Macleod 325)). Es will wenig besagen, daß wir den speciellen Mechanismus der Oberflächen-Beeinflussung bei der Leberamylase nicht aufdecken können; denn leider können wir ja noch kaum eine specielle Hormonwirkung derart physiko-chemisch exakt verfolgen. Wir sehen nur überall dasselbe grundsätzliche Bild, daß das Antagonistenpaar Sympathicus-Nebennierenmark und Parasympathicus-Pankreas ganz intim mit Verschiebungen der dominirenden Ionen verbunden ist. Ganz roh ausgedrückt, ist das erste mit der Vorherschaft der „reizenden" einwertigen Kationen verbunden (Kalium); das andere mit den „drosselnden" zweiwertigen (Calcium); und wir können daraus den ganz allgemeinen Schluß ziehen, daß eben die neuro-hormonale Regelung des Zellstoffwechsels sich der betr. Elektrolyte bedient, um die Zelloberflächen am Ende dieses langen Weges rein dispersoidchemisch zu beeinflussen. Tatsächlich wirkt ja auch bei der Leberamylase Adrenalin wieder „reizend", d. h. lösend auf die Symplexe, Insulin „drosselnd". Zu einer ganz allgemeinen Vorstellung der Mechanismen reichen also diese primitiven Überlegungen aus; sehr viel weiter würde uns auch eine eingehende Darstellung dieser Wechselbeziehungen zwischen Hormonen und Elektrolyten für unser Problem nicht bringen; und eine solche gehört nicht hierher.

Ein einziges Bedenken muß hier noch eingeschaltet werden: es ist immerhin möglich, daß beide Hormone auch direkt auf das Enzymsystem wirken im Sinne einer Aktivirung resp. Hemmung durch die betr. Oxydationslage. Denn sowohl Adrenalin wie Insulin können als reversible Redox-systeme fungiren; und deren Bedeutung wird heute vielfach für andere Enzyme (Arginase, Proteasen) diskutirt. Auch bei diesen sieht man noch nicht klar, und bei der Amylase ist das Thema noch kaum angeschnitten worden (vgl. Purr, l. c. 12a). Es sei also auf diese Möglichkeit vorerst nur verwiesen.

Kurzum, wir führen den Regulirungsmechanismus auf Beeinflussung der Oberflächen zurück in dem Sinne, daß sie eine stärkere „Adsorption" oder „Desorption" sowohl von Amylase wie von Glykogen bewirken können. Dann ist es selbstverständlich, daß auch direkte Beeinflussungen der Zellkolloide ähnlich wirken, wie sie Lesser ausprobirt hat (ph-Verschiebungen, hypertonische Lösungen, oberflächenaktive Stoffe) (H.W. S. 740); aber das sind keine physiologischen Modelle. So sei nur erwähnt, daß der Einfluß der Narcotica im Sinne einer Steigerung der Zuckerabgabe

---

325) *J. J. R. Macleod*, Control of carboh. metabolism. Lancet 1932, I, 1079.

auch an der mit Eigenblut durchströmten Kaninchenleber von IWASE 326) bestätigt wurde; ebenso wirkt KCN.

Es ist also auch nicht mehr ganz korrekt, von einer „räumlichen Trennung" von Enzym und Substrat zu sprechen, wie LESSER es getan hat. Sie sind nicht räumlich getrennt, sondern sogar wahrscheinlich gemeinsam gebunden an Proteine, aber unter Bindung der auf einander eingestellten specifischen Gruppen von Ferment und Substrat. Es ist also auch die Vorstellung von LESSER überholt, daß sie sozusagen nun „zusammenkommen" können, wenn man das Zellgefüge zerstört: man zerstört die Architektur der Zelle und dadurch das Gleichgewicht der Symplexbindungen an den Oberflächen.

In diesem Sinne führen also auch die weiteren Versuche von LESSER 327) theoretisch nicht auf einen anderen Weg. Er stellte fest, daß feine Zerreibung der Froschleber (nach gründlicher Auswaschung von der Aorta aus in vivo, um den Fehler der Blutamylase auszuschalten), die Zuckerbildung in 1 h auf das etwa vierfache steigert, in derselben Größenordnung wie die anderen erwähnten Mittel der Oberflächenverdrängung und wie Adrenalin. Auch Muskel (Katze) verliert nach MACLEOD (l. c. 145) in 20—30′ sein gesamtes Glykogen, wenn man ihn in flüssiger Luft zerreibt.

Entscheidend für die vitale Regulirung der Amylasewirkung in der Leber und damit für den Anteil des ungemein verwickelten Systems der Regulirungen des Kohlenhydratstoffwechsels überhaupt, der grade durch den Aktivitätszustand des Systems Glykogen + Amylase bedingt ist, sind nicht diese Modellvorstellungen, sondern ganz überwiegend oder ausschließlich der hormonale Antagonismus, repräsentirt in erster Linie durch Nebenniere — Pankreas. Alle seit unserer Darstellung im H.W. unternommenen Arbeiten haben dies nur bestätigt: Adrenalin in vivo zugeführt „aktivirt" die Glykogenolyse, Insulin hemmt sie.

Dabei müssen wir von vornherein auf eine genauere Deutung dessen verzichten, was wir unter Aktivirung resp. Hemmung zu verstehen haben. Wir haben ja ausdrücklich betont, daß sich die Wirkung aller aktivirenden resp. hemmenden Mittel in diesem mikroheterogenen System auf jeweilig beide Anteilnehmer an den Symplexen, Glykogen wie Amylase, beziehen kann. Betrachten wir nur das Ferment allein, so kann — durch Adrenalin — eine wahre Aktivirung zu höchstmöglicher Wirkung erfolgen, durch Insulin eine wahre Hemmung, d. h. Herabsetzung seiner Wirkung. Hier könnten nun tatsächlich die Redox-potentiale eine Rolle spielen. Es ist aber auch denkbar, und wird bisweilen von klinischer Seite betont, s. z. B. BRENTANO 328), daß Insulin gradezu die Synthese gegenüber der Spaltung begünstigt. Wir können das weder beweisen noch ablehnen; die vitale enzymatische Synthese ist eine terra incognita. Jedenfalls würden auch hier bestimmte Oberflächenverhältnisse wichtig sein und (vielleicht) auch hier die Redox-Potentiale. Und endlich kann man sein Augenmerk mehr auf das Glykogen richten und sagen, daß Adrenalin (resp. Insulinmangel im Diabetes) das Glykogen „lockert", Insulin es verfestigt (BRENTANO). Damit ist aber wirklich nichts wesentlich Neues gesagt; denn in der ganzen Enzymchemie spielen niemals die Fermente an sich, sondern immer ihre Wechselbeziehungen mit ihrem Substrat eine Rolle; man kann also geradesogut sagen, daß die Amylase „aktivirt" oder „gehemmt" wird, wie daß das Glykogen gelockert oder verfestigt wird. Entscheidend sind eben immer die Symplexe als Ganzes. Es hat also wenig Zweck, diesen Überlegungen weiter nachzugehen. Rein enzymchemisch sind es beinahe Tautologien, — wenigstens vorläufig. Vielleicht finden sich später neue Begriffe und neue Methoden, schärfer zu umgrenzen.

326) ***M. Iwase,*** Zuckerausschütt. aus der durchblut. Kaninchenleber. Mitt. Med. Ac. Kyoto, **10,** 949, 968 (1934); BPh **80,** 618/9. — 327) ***E. J. Lesser,*** Beschleun. der Zuckerbild.... durch Strukturzerstör. Bioch. Zs., **191,** 175 (1927). — 328) ***C. Brentano,*** Moderne Diabetesprobleme. D. med. Ws. **1935,** 365.

Diese mehr definitorischen Schwierigkeiten schätze ich also nicht hoch ein; die wahren und gewaltigen Schwierigkeiten liegen vielmehr in dem Vorbehalt begründet, den wir oben gemacht haben, daß sich diese Vorstellungen eben nur auf einen kleinen Ausschnitt aus dem gewaltigen Problem des KH-Stoffwechsels beziehen, und daß es kaum möglich ist, die reine Glykogenolyse mit ihren Mechanismen isolirt herauszuschälen. Es kommen dann alle weiteren Teilprobleme hinzu, die Bedarfsdeckung an Zucker durch Abruf aus der Leber, die Gluconeogonie, und die Zuckeroxydation selbst, bei welch letzteren beiden Vorgängen wieder Adrenalin und Insulin und die dazugehörigen Nerveneinflüsse als Antagonisten auftreten können. Und weiterhin ist bereits das Einsetzen dieser hormonalen Steuerungen wieder abhängig von den Bedingungen des KH-Stoffwechsels selbst, wobei der Blutzucker als kontrollirendes Moment wirkt: jede Unterschreitung des normalen Pegels ruft die Entsendung von Adrenalin hervor, jede Hypoglykämie die von Insulin, z. T. direkt, z. T. auf nervösem Wege über Sympathicus oder Vagus. (Lit. bei KÜHNAU, l. c. 318). Und auch über diese relativ einfache Regulation hinaus ist ja schließlich der Bedarf der peripherischen Organe, gekennzeichnet eben durch die Inanspruchnahme des Blutzuckers, in der Norm das auslösende Moment für alle Regulationen des KH-Stoffwechsels, mögen diese hormonal oder nervös sein; und wir können die Wirkung auf die Leberamylase allein nur sehr willkürlich aus diesem vielverschlungenen Netz herausholen. Nur als ein Beispiel sei an die überaus verwickelten Beziehungen der Abnahme und Zunahme des Leberglykogens bei den verschiedensten Eingriffen in die Nervenfunktionen erinnert (Narkose, Dekapitation, Enervirung der Leber etc.), z. B. EVANS **329)**. So versinkt denn dieses Teilproblem im Gesamtproblem des KH-Stoffwechsels überhaupt, und wir können darauf nicht weiter im Einzelnen eingehen. Einiges Wenige über die experimentelle Beeinflussung der Glykogenolyse haben wir im Vorangegangenen (§§ 404—407) bereits gebracht, besonders bei Leber; hier seien noch einige mehr das Allgemeine treffende Arbeiten erwähnt.

Der genannte Antagonismus Adrenalin—Insulin ist vielfach und unter den mannigfachsten Bedingungen und Variationen bestätigt worden. Es muß aber nochmals betont werden, daß er sich durchaus nicht auf die Glykogenolyse beschränkt, sondern in allen Stadien des KH-Stoffwechsels zu finden ist. So fand BISCHOFF **330)** ihn auch dann, wenn die Leber vorher durch Vergiftung mit Synthalin völlig glykogenfrei gemacht war. Es sei dazu ganz kurz bemerkt, daß Adrenalin die Zuckeroxydation hemmen kann. Ebenso kann nur darauf verwiesen werden, daß es eben im Wesen des die Norm beherrschenden Antagonismus ist, daß jede Schwankung nach der einen Seite sofort die reflectorische Aussendung des anderen Hormons bedingt. So bewirkt Insulin eine Abgabe von Adrenalin und umgekehrt, was natürlich die Dinge am normalen Tier ungemein verwickelt. Nur als ein Beispiel sei genannt, daß nach CORI **331)** Zufuhr von Insulin ebenso wie von Adrenalin den Gehalt des Muskels an Zuckerphosphat erhöht, bei nebennierenlosen Tieren wirkt aber Insulin nicht; es ist dies also jedenfalls eine Adrenalinwirkung. Ähnliche Befunde bei CORKILL **332)**, der eine Differenz zwischen Glykogenschwund und der Summe von Glucose + Milchsäure fand und dies auch bei Insulinwirkung auf eine secundäre Wirkung des Adrenalins zurückführt. Wirkungen im entgegengesetzten Sinne, Umkehrung der primären Adrenalinwirkung, Zunahme des Leber-

---

329) ***C. L. Evans, F. G. Young c.s.***, Liver glycogen etc. Jl. of Phys., **73**, 67, 81, 103; **76**, 413 (1931/2) — 330) ***Fr. Bischoff, M. L. Long***, Carboh. metabol. foll. guanidine deglycogenation. Jl. of Nutr., **3**, 201 (1930); BPh **59**, 85. — 331) ***C. F. Cori, G. T. Cori***, Infl. of epinephrine and insul. on hexoseph. Jl. of Biol. Chem., **94**, 581 (1931). — 332) ***A. B. Corkill, H. P. Marks***, Eff. of adren. on muscle glycogen. Jl. of Phys., **70**, 67 (1930).

glykogens, beobachteten z. B. HYND c. s. **333**). Über die außerordentlich feine Regulirung dieses Mechanismus, so daß die Adrenalinabgabe schon bei geringen Herabsetzungen des Blutzuckers, sofort nach Insulin-injection erfolgt, s. MEYTHALER **333a**).

Jedenfalls aber können wir davon ausgehen, daß der primäre Effekt des Adrenalins Steigerung der amylatischen Wirkung ist, während Insulin sie hemmt. Dies leuchtet durch alle noch so komplicirten Verhältnisse hindurch; so geben COLWELL c. s. **334**) an, daß auch bei starkem Angebot an injicirter Glucose das Gleichgewicht auf diesem Wege erhalten wird (neben stärkerer Zuckerverbrennung nach Insulin). Den direkten Nachweis an der mit Eigenblut durchströmten Kaninchenleber konnte IWASE führen (s. u. l. c. 347).

Adrenalin wirkt ebenso wie auf die Leber auch auf den Muskel, und zwar nach EVANS **335**) (Gegensatz zu WERTHEIMER, l. c. 320) auch auf den enervirten Muskel. Diese Adrenalinwirkung auf das Muskelglykogen ist besonders eingehend von CORI **335, 336**) untersucht worden (vgl. l. c. 322/3); sie tritt besonders unter anaeroben Bedingungen auf, so daß CORI **337**) an eine Wirkung des Adrenalins über Gefäßkonstriktion und Asphyxie des Muskels denkt.

Bei pankreopriven Tieren (durch Insulin gesund erhalten) bewirkt nach BOLLMANN **338**) Adrenalin starke Glykogenabnahme im Muskel, wenig in der Leber. Sehr bildhaft sind die Ergebnisse von ROESE **339**), daß beim leberlosen Tier, einem Nebennieren-Extremitäten-präparat, zugeführte Glucose nicht als Glykogen in den Muskeln, sondern nur als Milchsäure im Blute auftritt; hier verhindert also das allein dominirende Adrenalin den Glykogenaufbau. Die Mobilisirung durch Adrenalin betrifft auch das „unbekannte KH" des Muskels (§ 406) (BISCHOFF **340**)).

Der Sachverhalt wird nur dadurch für den Gesamthaushalt der Leber komplicirt, daß bei großem Angebot von Milchsäure aus dem Muskel nach Adrenalin die Leber diese zu Glykogen aufbaut, wie zuerst CORI (l. c. 322) gefunden und viele Untersucher bestätigt haben (z. B. **341—343**)). Das kann also dazu führen, daß nach Adrenalin der Glykogengehalt der Leber sich im Ganzen vermehrt, was also nicht etwa auf eine „Passivirung der Amylase" zu beziehen ist. Dies gilt besonders für Lebern mit geringem Glykogengehalt und kleinere Adrenalindosen (z. B. HYND **333**)). EVANS **344**) konnte die Umwandlung in Leberglykogen nicht unter allen Umständen bestätigen, so nicht unter Amytalwirkung (Ratte) und bei der hungernden Katze.

Ist schon die Adrenalinwirkung schwer zu analysiren, so ist dies für das **Insulin** bisher praktisch unmöglich, so lange wir seine Grundwirkung überhaupt noch nicht klargestellt haben, und jede Änderung der Bedingungen neue Versuchsergebnisse zeitigt. Tierart, Ernährung, Gehalt der Leber an Glykogen, Dosis des Insulins etc. führen je nachdem zur Vermehrung oder Minderung des Leberglykogens, wobei wohl sicher die reflektorische „Herauslockung" des Adrenalins" eine Rolle spielt; ebenso aber auch ein Mehrverbrauch an Zucker, der Abbau von Glykogen in der Leber erzwingt. Das alles ist noch unklar. Nur beim pankreopriven Tier ist die Vermehrung des Leberglykogens ganz sicher (Lit. bei v. LEDEBUR l. c. 319), und ebenso eindeutig auf eine Hemmung der übermäßigen Glykogenolyse

333) ***A. Hynd, D. L. Rotter,*** Eff. of adrenaline on the distrib. of glycogen etc. Biochem. Jl., **27**, 165 (1933). — 333a) ***F. Meythaler c.s.,*** Blutzuckerabfall b. Menschen nach .... Insulindarr. Arch. für exp. Path., **178**, 315, 320, 330 (1935); BPh **89**, 563. — 334) ***A. R. Colwell, E. M. Bright,*** Use of const. glucose inj.... in carboh. metabol. Amer. Jl. Phys., **92**, 543 (1930). — 335) ***C. F. Cori c.s.,*** Mech. of epinephr. act. etc. Jl. of Biol. Chem., **84**, 683, **86**, 375 (1929); Amer. Jl. Phys., **93**, 273, **94**, 557 (1930). — 336) ***C. F. Cori, G. T. Cori,*** KH-Bilanz ... nach Insulin und Adrenalinin. Bioch. Zs., **206**, 39 (1929). — 337) ***K. W. Buchwald, C. F. Cori,*** Action of epinephrine and insulin etc. Jl. of Biol. Chem., **92**, 355, 367 (1931). — 338) ***J. L. Bollmann, F. C. Mann, Ch. M. Wilhelmj,*** Origin of glucose liber. by epinephrine etc. Jl. of Biol. Chem., **93**, 83 (1931). — 339) ***H. F. Roese,*** Bez. der Nebenniere zum KH-Stoffw. Zs. exp. Med., **78**, 426 (1931). — 340) ***Fr. Bischoff, M. L. Long,*** Eff. of adren. upon the free muscle sugar and total carboh. Jl. of Biol. Chem., **95**, 743 (1932). — 341) ***H. E. Himwich c.s.,*** Glucose-lactic acid cycle involv. muscle and liver. Jl. of Biol. Chem., **85**, 571 (1930). — 342) ***E. Geiger,*** Mobilis. des Muskelglykogens durch Adrenalin etc. Bioch. Zs., **223**, 190 (1930). — 343) ***I.-I. Nitzescu, N. Munteanu,*** Act. diff. de l'adrén. sur le glycogène. Soc. Biol. **108**, 294 (1931). — 344) ***C. L. Evans, F. G. Young c.s.,*** Act of adrenaline on glycog. distrib. etc. Jl. of Phys., **73**, 103 (1931).

zu beziehen, die zum mindesten eine der wesentlichen Ursachen des Diabetes mellitus ist (v. NOORDEN). So muß denn für die Wirkung des Insulins beim normalen Tier auf die speciellen Zusammenfassungen, so z. B. KÜHNAU (l. c. 318) und v. LEDEBUR (l. c. 319) verwiesen werden. Danach ist es vielfach nicht gelungen, die direkte Hemmung der Glykogenolyse an der Leber nachzuweisen, wenigstens beim Warmblüter. Dagegen läßt sie sich bei der Froschleber einwandsfrei zeigen. v. ISSEKUTZ, dem wir den ersten sicheren Nachweis verdanken (*l. c. 754*), hat seine Ergebnisse mit kristallisirtem Insulin bestätigt (**345**). BUCHWALD u. CORI **337**) konnten diese Insulinwirkung besonders deutlich dadurch zum Ausdruck bringen, daß sie unter Versuchsbedingungen prüften, unter denen ein vermehrter Glykogenabbau in der Leber stattfindet: 18—42 Stunden vorher injicirtes Insulin hemmte oder unterdrückte völlig die sonst bei Anaerobiose oder durch Adrenalin eintretende Glykogenolyse der Leber.

Beim Warmblüter ist man meist gezwungen gewesen, sich mit allerlei indirekten Hilfsmitteln zu begnügen. Man kann versuchen, die Abnahme oder den Zuwachs an Glykogen in der Leber aus verschiedenen analytischen Werten zu berechnen (Glykogen-gehalt, freier Leberzucker, Blutzucker), wie dies vielfach unternommen wurde, so z. B. von CORI (l. c. 335), SAHYUN u. LUCK **346**), MOLITOR und POLLAK (l. c. 134). Ganz sichere Resultate sind bei der komplicirten Sachlage nicht zu erwarten, und die einwandfreieste Methode der direkten Durchströmung der Leber ist beim Warmblüter häufig ohne Ergebnis geblieben. Jedoch ist der unmittelbare Nachweis auch auf diesem Wege gelegentlich gelungen, so IWASE **347**) beim Kaninchen (Durchströmung mit eigenem Blut). Weitere Lit. über erfolgreiche Versuche verschiedener Art bei KÜHNAU und v. LEDEBUR. — An Leberschnitten (normale und pancreoprive Tiere) gelang GRAFE **348/9**) der direkte Nachweis der Insulinhemmung. — Herabsetzung an menschlichen Leichenlebern nach Insulinbehandlung s. POPPER (§ 405, l. c. 135). Dem allen gegenüber fand neuerdings wieder BÜRGER **349a**) bei direkter intraportaler Injection von kristall. Insulin binnen 6 h eine Abnahme des Leberglykogens um 55 %, bedingt durch die Zuckerverarmung des Blutes; dies ist wohl auch wieder eine Adrenalin-wirkung (vgl. 333a).

Die Einbeziehung **anderer endokriner Einflüsse** sei hier nur ganz flüchtig erwähnt; einige rein experimentelle Befunde über die Amylasen selbst sind bei Blut, Leber etc. gegeben; hier nur einige wenige, speciell auf das Leberglykogen zielende Angaben. Die Gesamtfrage der Wirkung der einzelnen Hormone auf den KH-Stoffwechsel als Gesamterscheinung kann hier nicht einmal gestellt werden (neuere Lit. bei REISS **350**)).

Thyroxin bewirkt Abnahme des Leberglykogens; Insulin + Fructose wirken antagonistisch (KNITTEL **351**)); auch SCHARLES (l. c. 124) fand Amylase-Steigerung in der Leber nach Thyroxin. Hypophysen-hinterlappen (Tonephin) wirkt direkt auf die Leber, nicht den Muskel, Glykogen abbauend, parallel mit und unabhängig vom Adrenalsystem (THADDEA **352**)). Insulin wirkt bei lebergesunden Tieren auch hier antagonistisch. Der Hypophysen-Vorderlappen wirkt dagegen aktivirend auf die Glykogenolyse (FLUCH c. s. **353**)), wie denn ja überhaupt der HVL im KH-Stoffw. Antagonist des Pankreas ist insofern, als bei hypophysopriven Tieren keine Hyperglykaemie zu stande kommt; so ist auch bei hypophysopriven Fröschen die Glykogenolyse gehemmt. Nebennieren-Rinde hat keinen ersichtlichen Einfluß (ROHSE l. c. 339).

345) ***B. v. Issekutz, J. Szende,*** Wirk. des Insül. auf die Zuckerprod. Bioch. Zs., **272**, 412 (1934). — 346) ***M. Sahyun, J. M. Luck,*** Eff. of epinephrin on glycogen metabol. Jl. of Biol. Chem., **85**, 1 (1929). — 347) ***M. Iwase,*** Einfl. des Insulins etc. auf die Zuckerausschüttung etc. Mitt. Med. Ac. Kyoto, **10**, 961 (1934); BPh **80**, 619. — 348) ***E. Grafe, H. Reinwein, H. Singer,*** Insulinwirkung I. Arch. für exp. Path., **119**, 91 (1926). — 349) ***A. Balzer, E. Grafe, Fr. Partsch,*** Insulinwirkung II. ebd., **120**, 359 (1927). — 349a) ***M. Bürger, H. Kohl,*** Einw. krist. Insulins auf den Glykogengeh. der Leber. Arch. für exp. Path., **178**, 269 (1935); BPh **89**, 554. — 350) ***M. Reiss,*** Das endokrine System (ausser Pankreas) Hb. der Bioch. Erg. Werk Bd. III, Jena 1935. — 351) ***G. Knittel,*** Beinfluss. des Leberglyk. unter Thyroxinwirk. stehender Tiere durch Insulin. Zs. exp. Med., **76**, 362 (1931). — 352) ***S. Thaddea, A. Waly,*** Angriffsp. des . . . Hypoph. H.L.-Horm. auf d. KH-Stoffw. Arch. für exp. Path., **172**, 535 (1933). — 353) ***M. Fluch, H. Greiner, O. Loewi,*** Hyp.-Vorderl. und Glykogenolyse. Arch. für exp. Path. **177**, 167 (1935).

II. Sonstige Polyasen.

A. Fructanasen.

1) Fructane, Inulin etc.

§ 411. Allgemeines und Vorkommen. Die Fructane, d. h. alle nicht mehr zuckerartigen Polyosen, die auf der Basis von Fructose aufgebaut sind, sind in zahlreicheren Abwandlungen in der Natur verbreitet, als wir im H.W. S. 743 angegeben haben. Es liegen hier anscheinend die Verhältnisse etwas anders als bei Stärke und Cellulose. Diese sind als Naturprodukte zwar auch von wechselnder äußerlicher Beschaffenheit; aber schließlich gibt es doch fast immer nur solche Formen, die man immer noch als „Stärke" resp. als „Cellulose" bezeichnet, und nur wenige andere, die man besonders benennt, wie „Isolichenin" (S. 380) als Abart der Stärke oder „Lichenin" als Abart der Cellulose. Sie haben eben immer noch einen sehr hohen Polymerisationsgrad, so daß die relativ kleinen Differenzen nicht ausreichen, um die Stoffe besonders zu bezeichnen. Bei den Fructanen, die weniger hochmolekular sind, treten naturgemäß die — hauptsächlich oder ausschließlich — durch die Molgröße bedingten Unterschiede stärker hervor: es gibt somit mehrere „Polylaevane", die wir hier systematisirend Fructane nennen wollen. Es sei aber gleich betont, daß hier nicht eine auch nur einigermaßen lückenlose „polymer-homologe Reihe" von Fructose-anhydriden vorliegt; es gibt nur wenige Typen inbezug auf die wahre Molgröße, und die verschiedenen Stoffe unterscheiden sich in der Hauptsache strukturell von einander.

Sie unterscheiden sich auch enzymtypisch. Wenn wir vorläufig einmal daran festhalten wollen (§ 412), daß Inulin selbst und seine nächsten Verwandten nicht durch Saccharase an sich, sondern durch ein eigenes Enzym Inulase gespalten werden, so gibt es doch niedere Fructane, die tatsächlich durch die normale Hefensaccharase zerlegt werden (Schlubach 1)); sie sind enzymtypisch noch als etwas höhere Oligosen anzusehen, wie ja auch z.B. Cellohexaose noch durch Cellobiase zerlegt wird (S. 271). Im einzelnen ist freilich die chemische Individualität noch umstritten; auch für das „Inulin" selbst ist die allgemeine Einheitlichkeit noch fraglich, es scheint mehrere Abarten zu geben, wahrscheinlich als verschiedene Gemische hochmolekularer Fructane (Schlubach 2)).

Es sind eine ganze Menge solcher angeblich vom Inulin verschiedenen Fructane bereits in der älteren Literatur angegeben. Tanret (*l. c. 761*) hatte in Compositen unterschieden: neben Inulin nach Pseudo-inulin, Inulenin, Helianthenin, Synanthrin, die neuerdings Gillot 3)

---

1) ***H. H. Schlubach, W. Flörsheim,*** Polylaevane der Blätter. Zs. phys. Chem., **198**, 153 (1931). — 2) ***H. H. Schlubach, H. Elsner,*** Natur des Inulins. Ber. Chem. Ges., **62**, 1493 (1929). — 3) ***P. Gillot, E. Legras,*** Glucides de rés. du Petasites. Bull. Sci. Pharm., **34**, 205 (1927); BPh **41**, 505.

auch in den unterirdischen Organen von *Petasites officinalis* gefunden hat. Daneben wurde früher noch angegeben: Synanthrose, Inuloid in Compositen; sowie in Gramineen noch Lävusin, Triticin, Graminin (Tabelle bei SCHLUBACH 2)); ferner noch Phlein und Apeponin bei v. EULER 4). Auf die Sinistrine A und B in der *Scilla* (SCHLUBACH) kommen wir gesondert zurück. Weitere angeblich vom Inulin durch kleineres Molgew. verschiedene Fructane fand BELVAL 5) in Zwiebeln von *Lycoris squamigera Max.*, Lycorosid und (nicht sicher) Asphodelosid (NEYRON 6)); letzteres partiell durch Saccharase spaltbar. Molg. von Lycorosid kryosk. = ca. 1350, des anderen 600. Endlich ist das **Irisin** aus *Iris*-arten lange bekannt. Es ist von v. EULER 4) genau untersucht worden (s. u.). COLIN 7, 8) fand das eigtl. Irisin in *Iris pseudacorus*; im Rhizom von *Iris foetidissima* kommt neben Stärke ein anderes Fructan vor, das anscheinend ein Dilaevan ist (s. u.), während Irisin ($[\alpha]_D = -51°$) 7—8 Fructosen enthält. Resistent gegen Saccharase, Amylase und Taka, nur von Pilzenzym, Inulase, gespalten (vgl. aber l. c. 71). Von Pilzen langsam verbraucht, ohne daß freie Fructose auftritt. Über seine Struktur und hydrolytischen Abbau s. u., ebenso über die des Graminins.

Dagegen gibt es nach den Ergebnissen von SCHLUBACH 9) nur ganz wenige wirklich individuelle Fructane; darauf kommen wir bei den Strukturfragen zurück. Hier sei also nur vorausgeschickt, daß er in *Helianthus* nur zwei chemisch definirte Stoffe fand, neben dem einheitlichen Inulin noch das Dilaevan. Dazu noch ein weiteres, vielleicht aber sekundär entstandenes Fructoseanhydrid (15). Aus Gemischen dieser Stoffe bestehen fast alle oben genannten Substanzen. Eine polymer-homologe Reihe von „Inuliden" existirt nicht. Dagegen sind die Fructane aus anderen Pflanzen strukturell verschiedene Stoffe, so das eben genannte Irisin, das Graminin und ein weiteres Laevan aus Gräsern (s. u.).

Zur **Physiologie der Fructane** liegen nur wenige neuere Mitteilungen vor. COLIN 10) zeigte bei *Helianthus*, daß — wie bereits bekannt — die Blätter kein Inulin enthalten; es bildet sich im Stengel und wandert durch die Gefäße in die Wurzel, nicht durch den Siebteil, da es sich im Stengel hauptsächlich im Holz befindet. SCHLUBACH 11) hat diese Angaben bestätigt. Bei *Iris* gehen beim Knospen die Fructane schnell in die Blattstärke über (COLIN l. c. 7).

Struktur des Inulins (s. a. PRINGSHEIM 12)). Inulin ist — wie schon BÉCHAMP 1893 angegeben hatte —, aus heißer wäss. Lösung in doppeltbrechenden Sphärokristallen zu erhalten (HOCHE 13)), sonst in Nadeln. Ein wirklich reines Inulin haben wohl zuerst PRINGSHEIM 14) und SCHLUBACH und SCHMIDT 15) in Händen gehabt. SCHLUBACH hat (mit KNOOP 9) und SCHMIDT 15)) endgiltig gezeigt, daß die Inuline aus *Dahlia* und Topinambur (*Helianthus tuberosus*) identisch sind, das von *Cichorium* weicht etwas ab ($[\alpha]_D^{20} + -40{,}1°$ resp. $-38{,}1°$; etwas andere Hydrolysenkonstante). Reines Inulin besteht ausschließlich aus Fructose und zeigt keine Reduction. Die Fructose ist ausschließlich Fructo-furanose.

---

4) ***H. v. Euler, H. Erdtmann***, Irisin etc. Zs. phys. Chem., **145**, 261 (1925). — 5) ***H. Belval***, Glucides lévogyres des oignons de Lycoris. C. R., **193**, 891 (1931). — 6) ***C. Neyron***, Princ. fermentescibles des tuberc. d'Asphodèle. Thèse, Paris, 1930, cit. n. BELVAL. — 7) ***H. Colin, V. Estienne***, Utilis. des lévulosanes par les organismes. Bull. Soc. Chim. Biol., **6**, 431 (1924). — 8) ***H. Colin, A. Augem***, Lévulosanes des Iris. ebd., **10**, 489 (1928). — 9) ***H. H. Schlubach, H. Knoop***, Kohlenhydr. d. Topinambur. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **497**, 208 (1932). — 10) ***H. Colin***, Form. . . de l'inuline etc. C. R., **179**, 1186 (1924). — 11) ***H. H. Schlubach, W. Flörsheim***, Bild. der Polylaevane etc. Zs. phys. Chem., **198**, 158 (1931). — 12) ***H. Pringsheim***, Polysaccharide, III. Aufl. Berlin 1931, S. 275. — 13) ***B. Hoche***, Fabrikmäß. Gewinn. von Lävulose. Zs. V. D. Zuck., **76**, 821 (1926). — 14) ***H. Pringsheim, P. Ohlmeyer***, Inulin XII, XIII. Ber. Chem. Ges., **65**, 1242, **66**, 1292 (1932/3). — 15) ***H. H. Schlubach, H. Schmidt***, Ident. des Inulins aus versch. Pfl. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **520**, 43 (1935).

Ob die daneben beim Abbau entstehende Aldose zum Molekül des Inulins gehört, ist zweifelhaft; sie entsteht vielleicht als Kunstprodukt durch Umwandlung der labilen h-Fructose. Bei der enzymatischen Hydrolyse ist sie bald gefunden, bald vermißt worden, worauf wir unten zurückkommen.

Über das Röntgen-Diagramm s. KATZ 16). Trockenes Inulin hat ein anderes als feuchtes. Anscheinend verlieren die Micellen beim Trocknen etwas im Gitter gebundenes Wasser. Durch Fällung des bei 100° gelösten Inulins mit viel abs. Alkohol erhält man ein amorphes Insulin, das im Exsikkator schnell wieder in das kristall. übergeht (17) (vgl. BERNER (l. c. 33) und SCHLUBACH (l. c. 35)).

Das Dilaevan. SCHLUBACH und ELSNER 18) haben synthetisch aus Fructose durch HCl-haltiges Aceton über ein Fructose-anhydrid ein Di-h-fructose-anhydrid erhalten, das wahrscheinlich den Kettenbaustein des Inulins darstellt (s. u.). Dieser selbe Stoff findet sich auch natürlich vor, und zwar als Bestandteil des lange bekannten **Sinistrin** **(19)**, eines Reservekohlenhydrates der *Scilla maritima.* Neben diesem Sinistrin A, das in Alkohol leichter löslich ist, und einen Drehwert von — 25,3° hat, gibt es noch ein B, $[\alpha]_D^{20} = -30{,}6°$, anscheinend mit dem doppelten Molgewicht. Keine Reduktion, Methylirung und Spaltung ergibt dasselbe Produkt wie Inulin selbst, 3,4,6-Trimethyl-fructo-furanose; das Methylirungsprodukt an sich ist dem Trimethyl-inulin sehr ähnlich, anscheinend hochmolekular. Dasselbe Anhydrid entsteht bei der anhydrischen Aufspaltung des Inulins selbst **(20)**; es ist mit dem von PICTET erhaltenen Difructose-anhydrid identisch (s. u.).

Ein ähnliches, aber nicht voll identisches Dilaevan fand SCHLUBACH (l. c. 1) in den Blättern von *Yucca filamentosa,* es ist dies das durch Hefesaccharase spaltbare Laevan, wird somit von Hefe vergoren. Auch das von COLIN (l. c. 7) scheint dasselbe, aber nicht rein zu sein ($[\alpha]_D = -29°$). Dieses Dilaevan ist nach SCHLUBACH und KNOOP (l. c. 9), das einzige außer dem Inulin auch in *Helianthus* vorkommende Naturprodukt; Zwischenglieder zwischen ihm und dem Inulin selbst in einer polymer-homologenen Reihe sind wie erwähnt nicht vorhanden.

Einige andere Difructoseanhydride, die säureresistent und rechtsdrehend sind (I, II, III, mit + 27°, 13,85°, 135,6°) haben JACKSON c. s. **21)** aus den Rückständen der Säure-hydrolyse isolirt, was PRINGSHEIM **22)** bestätigte . HAWORTH **23)** hat I über das Acetylprodukt methylirt und bei der Spaltung dieselbe 3,4,6,-Trimethyl-fructofuranose wie aus Inulin erhalten; er fand die Struktur eines Difructofuranose-1,2-anhydrids mit einem Dioxanring und nimmt an, daß diese Verbindung nichts mit dem Aufbau des Inulins (s. u.) zu tun hat, sondern ein sekundäres Produkt der Säurewirkung auf die bei der Sprengung der Kette freigewordenen Fructosereste ist, die sich derart stabilisiren. Die von IRVINE **24)** beim Abbau von Inulinacetat erhaltene Substanz ist damit identisch, und seine frühere Annahme, daß sie aus der Struktur des Inulins selbst stammt (s. u.) ist somit hinfällig **(25)** (l. c. 56). I ist also zweifellos ein sekundäres Produkt. Für III gilt dies nicht so sicher, da es SCHLUBACH **26)** (dieselbe oder eine sehr ähnliche Substanz) aus Topinambur

---

16) ***J. R. Katz, J. C. Derksen,*** Rö-Spektrum des Inulins. Réc. Trav. chim., **50,** 248 (1931). — 17) ***J. R. Katz, A. Weidinger,*** Amorphes u. kristall. Inulin. ebd., **50,** 1133 (1931). — 18) ***H. H. Schlubach, H. Elsner,*** Synth. des Grundkörp. des Inulins. Ber. Chem. Ges., **61,** 2358 (1928). — 19) ***H. H. Schlubach, W. Flörsheim,*** Konst. des Sinistrins. ebd., **62,** 1491 (1929). — 20) ***H. H. Schlubach, H. Elsner,*** Sinistrin A (Dilaevan) als Abbauprod. des Inulins. ebd., **63,** 362, 2302 (1930). — 21) ***R. F. Jackson c. s.,*** Cristall. difructose anhydr. from ... inulin. Bureau of stand. Jl. Res., **3,** 27 (1929), **5,** 1151 (1930), **6,** 709 (1931). — 22) ***H. Pringsheim, W. G. Hensel (P. Ohlmeyer),*** Inulin XI, XII. Ber. Chem. Ges., **64,** 1431 (1931), **65,** 1242 (1932). — 23) ***W. N. Haworth, H. R. L. Streight,*** Struct. of inulin. The derived di-fructose-anhydr. Helv. Chim. Acta, **15,** 693 (1932). — 24) ***J. C. Irvine, J. W. Stevenson,*** Mol. Struct. of inulin. Jl. Amer. Chem. Soc., **51,** 2197 (1929). — 25) ***E. W. Bodycote, W. N. Haworth, C. S. Woolvin,*** Mol. Struct. of inulin. Jl. of Chem. Soc., **1932,** 2389. — 26) ***H. H. Schlubach, H. Knoop,*** Kohlenhydr. der Topinambur. II. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **504,** 19 (1933).

isoliren konnte. Für die sekundäre Entstehung spricht auch die Tatsache, daß es bei der enzymatischen Hydrolyse nicht entsteht (PRINGSHEIM 22), II); eine zuerst für I gehaltene Substanz erwies sich als Mannit, der aus dem Enzympräparat stammt. Wir werden also auf die Stoffe nicht mehr zurückkommen.

Anhydrische Depolymerisirung des Inulins. Die Zerlegung des Inulins durch wasserfreie Agentien in der Wärme führt in dieselben grundsätzlichen Probleme hinein, wie wir sie für die „Hexosane" aus Stärke (§ 371) geschildert haben. Es dreht sich immer wieder um die Frage, ob die Produkte, die man auf diesen Wegen erhält, die eigentlichen Bausteine der Polyose sind oder ihnen wenigstens insoweit nahe stehen, daß man aus ihrer Struktur Rückschlüsse auf den Bau selbst ziehen kann. Und damit im Zusammenhang steht die Frage, ob die gemessenen niedrigen Molgewichte reell sind, ob wirklich diese Stoffe reine niedermolekulare Abbaustufen sind. Diese Forschungen am Inulin stehen insofern sozuzagen zwischen denen an der Stärke und an der Cellulose, als hier sowohl die einfachen Depolymerisirungen wie die der Acetylprodukte vielfach untersucht sind. Ein endgiltiges Bild ist noch nicht gewonnen, es sei ohne viel Theorie ein Überblick über die Tatsachen gegeben.

Thermische Depolymerisirung. Mit derselben Methode wie bei der Stärke, Erhitzen mit Glycerol auf 120° bei 20 mm erhielten VOGEL u. PICTET 27) ein Produkt, das sie als ein Trifructosan $(C_6H_{10}O_5)_3$ ansahen, entsprechend der Annahme PRINGSHEIM's, (*l. c. 768, 769*) daß dies der „Grundkörper" des Inulins sei. Bei 140° geht die Zerlegung weiter zu einem Difructosan. Dieses reducirt Fehlingsche Lösung, $[\alpha]_D = -24{,}6°$, und bildet ein Acetat, das von anderen „Inulin-acetaten" ganz verschieden ist (s. u.). Dieses Difructosan ist nun ein zweifelloses und chemisch einheitliches Abbauprodukt, denn es ist nach SCHLUBACH und ELSNER (l. c. 20) mit dem Sinistrin A identisch. Dieses Difructosan-ist auch kein „Grundkörper", denn es hat eine andere Drehung als Inulin, und es associirt nicht in wäss. Lösung. Die von VOGEL angegebene Reduction beruht auf Beimengungen. — Durch Glykol bei 140° soll nach SCHLUBACH 28) ein Mono-fructosan entstehen; jedoch ist dies nach BERNER (s. u.) das Glykolfructo-furanosid.

Ebenfalls schließlich zu einem Difructose-anhydrid gelangte über verschiedene greifbare Zwischenstufen (4, 3 zu 2 Fructosen) PRINGSHEIM 29) durch fraktionirtes immer gesteigertes Erhitzen in Tetralin bis 290°. Und dasselbe erreichte er (30) durch Erhitzen in Chloroform mit Benzolsulfosäure als Katalysator (vgl. Glykogesan, § 371).

Ganz andere Eigenschaften sollen Abbauprodukte haben, die von PRINGSHEIM 31) und von VOGEL 32) erhalten worden sind, und zwar durch einen eher der reinen „Dispergirung" (s. u.) ähnlichen Vorgang, d. h. mit viel milderen Mitteln. PRINGSHEIM erhielt in Acetamid bei 80° ein **„Inulan"**, das dieselbe spec. Drehung hat wie das Inulin selbst, und beim Altern, sogar in festem Zustande, über ein Trifructosan wieder in hochpolymeres Inulin übergeht. Ungefähr dasselbe erzielte VOGEL 32) bei kurzem Erhitzen in Glycerol auf 95° bei 12 mm. Er erhielt bei unverändertem Drehwert ein sehr leicht in Wasser lösliches **„Iso-difructosan"**, das ebenfalls schon bei trockener Aufbewahrung, in konz. wäss. Lösung schon in 24 h wieder zu Inulin reassociirt. Hier sind also ganz verschiedene Dinge beobachtet worden: das starke Erhitzen mit Glycerol führt tatsächlich zu einem charakterisirbaren tiefen Abbau, die schonenderen Verfahren nur zu einer Scheindispergirung genau wie bei der Cellulose; sie sind auch ebenso fälschlich wie dort für die Theorie der „kleinen Grundkörper" ausgenützt worden.

---

27) ***H. Vogel, A. Pictet,*** Dépolym. de l'inuline. Helv. Chim. Acta, **11**, 215 (1928). — 28) ***H. H. Schlubach, H. Elsner,*** Therm. Abbau des Inulins etc. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **497**, 201 (1932). — 29) ***H. Pringsheim, I. Fellner,*** Inulin VI. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **462**, 231 (1928). — 30) ***H. Pringsheim, J. Reilly,*** Inulin VII. Ber. Chem. Ges., **61**, 2018 (1928). — 31) ***H. Pringsheim, J. Reilly, P. P. Donovan,*** Inulin VIII. Ber. Chem. Ges., **62**, 2378 (1929). — 32) ***H. Vogel,*** Inulin. Ber. Chem. Ges., **62**, 2980 (1929).

In der Tat hat BERNER 33) mit denselben Argumenten wie beim Glykogen (§ 371) die Deutungen von PRINGSHEIM und von VOGEL angegriffen; die hergestellten Präparate halten hartnäckig Glycerol resp. Alkohol (von der Fällung) fest, bis zu 19 %, so daß alle kryoskopischen Messungen wertlos werden. Nach Einwänden von REILLY und PRINGSHEIM 34) sowie SCHLUBACH 35) gibt er nur zu, daß man aus dem üblichen schwer löslichen kristallisirten Inulin durch die Prozeduren eine leicht lösliche amorphe Form herstellen kann, die an feuchter Luft wieder in die schwer lösliche zurückgeht. Aber auch die leicht lösliche hat keine Fähigkeit, Gefrierpunkts-Depressionen zu bewirken, es ist also ein rein dispersoid-chemischer Übergang zwischen zwei Inulinformen, kein Abbau. Bei voller Trockenheit hat Inulin in Acetamid ein Molgew. von ca. 4000, kryoskopisch gemessen. Tatsächlich fand BRINTZINGER (l. c. 50) mit seiner Methode des Dialysen-Koefficienten (S. 340), daß nach Weggang der Beimischungen das VOGEL'sche Inulin dasselbe Micellgewicht wie unverändertes Inulin besitzt.

In Wirklichkeit ist der sog. thermische Abbau bei stärkerem Erhitzen ein alkoholytischer Abbau, und dabei erfolgt wie bei der Stärke eine vollständige Spaltung unter Bildung der betr. Glykoside (35a, 36): sowohl mit Glycerol bei 140°, wie mit Glykol oder Methanol (170°); Spuren von Phosphorsäure setzen auch hier die Temp. stark herab (Glycerol 75°). Es entstehen die α-Fructofuranoside; auch das SCHLUBACH'sche (l. c. 28) Monofructosan ist in Wirklichkeit das Glykol-glykosid der Fructofuranose. Nochmalige Replik von PRINGSHEIM (l. c. 46).

Die Acetylirung: (Methodisches zur Acetylirung HAWORTH 37), HAGENBUCH 38)). Auch die anhydrische angebliche Depolymerisirung durch Einführung von Acetyl-gruppen hat dieselbe widerspruchsvolle Rolle gespielt wie bei anderen Polyosen, hier besonders der Cellulose. Wieder steht man vor der Frage, ob man den Molgewichts-Bestimmungen, besonders den kryoskopischen, irgend welchen Wert beimessen darf.

Wir haben bereits im H.W. S. 743 berichtet, daß PRINGSHEIM (*l. c. 765*) aus dem Verhalten des Inulinacetates den Schluß auf eine Struktur des Inulins selbst aus 3 Anhydro-tri-fructosen = 9 Fructosen gezogen hat. PRINGSHEIM 39) hat später dieses Inulin-triacetat noch sorgfältiger rein hergestellt und gezeigt, daß nach der Entfernung des Acetyls wahres Inulin wieder entsteht, das sich röntgenographisch und enzymtypisch (40) nicht von Inulin unterscheiden läßt. Dem ersten Befund PRINGSHEIM's entgegen fanden BERGMANN 41) und HESS 42) Inulinacetate mit einer scheinbaren Molgröße von 2 oder sogar 1 Fructosen in Eisessig, je nach der Verdünnung. Und PRINGSHEIM 39) fand dann selbst an seinem reinen Triacetat dieselbe Molgröße bis zu 1,6 %iger Eisessiglösung, darüber die dreifache Association. BERGMANN hielt eine Zeit lang das Inulin für ein durch reine Association aus einem Di-fructose-anhydrid entstandenes Gebilde; aber VOGEL (l. c. 32) zeigte, daß das erst durch Glycerol hergestellte wirkliche Difructose-anhydrid bei nachfolgender Acetylirung einen ganz anderen Körper ergab, als das „Inulinacetat" von BERGMANN und HESS. HAWORTH 37) fand für sein Acetyl-inulin in Campher ein Minimal-Molg. von 6300 = 22 Fructosen. Wenn nicht alle Zeichen trügen, so sind also auch hier wie bei der Cellulose die kryoskopischen Messungen irreführend und besagen nichts für die wahre Molgröße.

Dasselbe wird dann auch wohl auch für die bloße „Dispergirung" der Fall sein, die sich an die milden Verfahren der „Desaggregirung" (s. o.) anschließt. So haben SCHMID 43) und

---

33) ***E. Berner***, Vermeintliche Depolymeris. des Inulins. Ber. Chem. Ges., **63**, 1356 (1930). S.A., **64**, 842, 1531 (1931). — 34) ***J. Reilly, H. Pringsheim***, Vermeintl. Depolym. des Glykogens. ebd., **63**, 3210 (1930). — 35) ***H. H. Schlubach, H. Elsner***, Depolym. des Inulins. Ber. Chem. Ges., **63**, 2302 (1930). — 35a) ***E. Berner***, Therm. Abbau von Inulin. Norske Vid. Selsk., **5**, H. 43 (1933). S.A. — 36) ***E. Berner***, Alkoholyt. Abbau von Inulin. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **505**, 58 (1933). — 37) ***W. N. Haworth, H. R. L. Streight***, Acetyl. and methyl. of inulin. Helv. Chim. Acta, **15**, 609 (1932). — 38) ***W. E. Hagenbuch***, Acetyl. von Inulin. ebd., **15**, 616 (1932). — 39) ***H. Pringsheim, W. G. Hensel***, Inulin IX. Ber. Chem. Ges., **63**, 1096 (1930). — 40) ***H. Pringsheim, R. Perewosky***, Inulase V. Zs. Phys. Chem., **153**, 138 (1926). — 41) ***M. Bergmann, E. Knehe (E. v. Lipmann)***, Indiv. Atomgruppe des Inulins. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **449**, 302 (1926), **458**, 93 (1927). S.A. — 42) ***K. Hess, R. Stahn***, Kryoskop. Verh. von Inulinacetat. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **455**, 104 (1927). — 43) ***L. Schmid, B. Becker***, Kryosk. Molg.-Best. mit flüss. Amm. Ber. Chem. Ges., **58**, 1968 (1925).

Reihlen 44) Inulin in wasserfreiem flüss. NH_3 gelöst und kryoskopisch wie tensimetrisch die Molgröße einer Difructose gefunden. Schmid 45) hat die Versuche mit besonderen Kantelen wiederholt und immer wieder den Wert 320 = Difructose-anhydrid gefunden. Dieselbe Molgröße (kryosk.) fand Pringsheim (l. c. 31) bei der Dispergirung in Formamid bei ca. + 2°. Spätere Versuche in Acetamid ergaben Schwankungen zwischen 3—10 Fructosen (46), es hängt von sehr geringen Mengen anorg. Beimengungen ab (Reilly 47)); je weniger Asche, desto höhere Mol-G.

Bei der direkten Molgew.-Best. von Inulin in Wasser ergaben sich ganz wechselnde Resultate, über die bei Pringsheim (l. c. 12, S. 284) nachzusehen ist. Pringsheim selbst 48, 49) fand sehr wechselnde Werte, die von der Vorbehandlung abhängen; schon umgefälltes Inulin ergibt niedrigeren „Ballungszustand" von etwa 7 Fructosen, beim Aufbewahren geht es in höhere Associate zurück (vgl. dazu Berner (l. c. 33) betr. amorphes Inulin). Drew u. Haworth 52) fanden ebullioskopisch bei frischen Präparaten nie unter 3200 (entsprechend den Acetylderivaten); aber bei Wiederholung der Versuche < 900, da Inulin in heißem Wasser hydrolytisch zerfällt (s. u.).

Unter diesen Umständen hat schließlich Pringsheim die Ansicht für das Inulin aufgegeben, daß es ein „Associat" ist und nimmt ebenfalls lange Ketten an.

Die Frage der Struktur des Inulins ist dann im Großen genau denselben Weg gegangen wie bei der Stärke auch. Über die Vorstelluug der „kleinen Grundkörper" ist man hinweggeschritten und zur „Kettentheorie" übergegangen. Daß das Dilaevan als solches nicht der „Grundkörper" eines Associats sein kann, geht — genau wie bei den Hexosanen der Stärke — daraus hervor, daß es eben ein ganz beständiger kristalloider Stoff ist, der nicht zur kolloidalen Association neigt, wie auch Pringsheim bereits 1931 (l. c. 12, S. 288) selbst angibt, als er noch an der Associate glaubte. Auch hier hätte man also an andere „Fructosane" leicht veränderter Art denken müssen; aber das ist Alles überholt. Inulin ist eine hochpolymere Kette von ca. 30 Fructosen, Molg. ca. 5000; das Micellgewicht nach der Methode Brintzinger (S. 340) 50) wird auf 80—100.000 angegeben.

Die Entscheidung bereitete sich wieder durch die Methylirung vor, die zuerst von Irvine (*l. c. 768, 769*) vorgenommen und dann von Haworth 51—54) durchgearbeitet wurde. Er erhielt ein einheitliches Trimethyl-inulin, das zu 3,4,6-Trimethyl-fructofuranose aufgespalten werden kann. Konstitutionsbeweis durch Oxydation zu Trimethyl-h-arabolacton von bekannter Struktur wie bei der Saccharose (S. 203). Eine andere Trimethyl-fructose entsteht nicht (Montgomery 55)). Damit war also zunächst festgestellt, daß Inulin nur aus Fructofuranose aufgebaut ist, und zwar in Ketten, die stets von 1 nach 2 glykosidisch gebunden sind. Die Kettenlänge beträgt mindestens 20—24 Fructosen; es sind durch direkte Molgew.-Best. immer nur Mindestwerte zu erhalten, da Inulin schon — besonders bei Gegenwart

---

44) ***H. Reihlen, K. Th. Nestle,*** Mol. G. des Inulins. ibid., **59,** 1159 (1926). — 45) ***L. Schmid, L. Haschek,*** Kryosk. Molg. Best. an ... Inulin in flüss. Amm. Sitzb. Akad. Wien IIb, **140,** 756 (1931). — 46) ***H. Pringsheim, H. Weiß,*** Kryosk. von ... Inulin etc. Ber. Chem. Ges., **65,** 1807 (1932). — 47) ***J. Reilly, P. P. Donovan,*** Kryosk. von ... Inulin etc. ibid., **65,** 1811 (1932). — 48) ***H. Pringsheim, J. Reilly,*** Inulin X. ibid., **63,** 2636 (1930). — 49) ***H. Pringsheim, I. Fellner,*** Inulin VI. Ann. Chem. Pharm. (Liebig), **462,** 231 (1928). — 50) ***H. Brintzinger, K. Maurer, J. Wallach,*** Molg. und therm. Abbau des Inulins etc. Ber. Chem. Ges., **65,** 988 (1932). — 51) ***W. N. Haworth, A. Learner,*** Structure of inulin. Jl. of Chem. Soc., **1928,** 619. — 52) ***H. D. K. Drew, W. N. Haworth,*** Mol. Kompl. of inulin. Jl. of Chem. Soc., **1928,** 2690. — 53) ***W. N. Haworth, H. R. L. Streight,*** Acetyl. and methyl. of inulin. Helv. Chim. Acta, **15,** 609 (1932). — 54) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, E. G. V. Percival,*** Mol. Struct. of inulin. Jl. of Chem. Soc., **1932,** 2384. — 55) ***T. N. Montgomery,*** Const. of inulin. Jl. Amer. Chem. Soc., **56,** 419 (1934).

von Spuren saurer Elektrolyte — durch heißes Wasser zerlegt wird, ebenso durch CO_2 oder Spuren von HCl, wobei anscheinend ein ganz allmählicher Abbau über „Dextrine" mit 8—3 Fructosen und ständig zunehmender Linksdrehung erfolgt (52). Ebenso ergab die Kryoskopie des Acetyl-inulins ca. 22 Glucosen (53); die nach anderen Methoden (BERGMANN, l. c. 41) erhaltenen Acetate erwiesen sich als bereits wahrhaft abgebaut (Molg. ca. 3000). Die Ketten sind gleichförmig; die dagegen von IRVINE (l. c. 24), auf grund des Befundes von einigen Prozent eines abweichenden Fructose-anhydrides geäußerten Bedenken konnten zerstreut werden (l. c. 25). Es gelang dann weiter (54), mit derselben Methode wie bei anderen Polyosen, nämlich durch Bestimmung der Endgruppen als Tetra-methyl-fructofuranose (S. 339), die Länge der Ketten rein chemisch zu bestimmen. Aus einem Gehalt von 3,7 % Tetra-derivat errechnet sich eine Länge von 30 Gliedern, Molg. = 5000. IRVINE 56) hat sich dem im wesentlichen dann angeschlossen. Er findet Tri : Tetra = 95 : 4 und errechnet somit 27—28 Fructofuranosen.

Fraglich sind nur zwei Dinge. Erstens, ob die Inulinkette eine Glucose enthält. Bei der Säurespaltung des Inulins entsteht immer Glucose; sie wird aber von SCHLUBACH (l. c. 15) als sekundäres Umwandlungsprodukt gedeutet. Entscheidend wäre ihr Nachweis bei der milden enzymatischen Spaltung. Hier haben sie BOURQUELOT u. BRIDEL 57) vermißt, und PRINGSHEIM 58) hat dies zunächst bestätigt; ebenso WEIDENHAGEN 59) auch bei totalem Abbau; aber PRINGSHEIM 60) hat später seine Ansicht geändert; er findet mit gereinigter Inulase von *Aspergillus* bei totaler Spaltung konstant 1,5 % Glucose; bei nicht völliger Spaltung bleibt die Glucose im Rest. Unter der Annahme einer Glucose in der Kette berechnet er daraus eine Länge von ca. 70 × C_6; Molg. ca. 11000. IRVINE 56) hält jegliche Glucosebildung für accessorisch.

Die zweite Frage ist die nach den Endgruppen. Zunächst ist noch nicht einmal völlig sicher, ob intaktes Inulin reducirt. HAWORTH 52) hatte Reduktion gefunden; SCHLUBACH 61) und PRINGSHEIM 60) haben sie bei ihren sehr hoch gereinigten, konstant drehenden (40—41°) Präparaten vermißt. HAWORTH schloß aus der Reduktion und der Empfindlichkeit gegen Alkali auf eine einfach freie Fructosegruppe am Ende; nach der anderen Ansicht wäre also die Reduktion ein Zeichen bereits eingetretener Hydrolyse zu „Inulindextrinen"; IRVINE 56) läßt die Frage offen. SCHLUBACH 61) hält eine einfach offene Kette für unmöglich, sieht aber gegen einen anhydrischen Schluß das Bedenken, daß man dann auch Dimethyl-fructose finden müßte. IRVINE hält es aber für möglich, daß ein langkettiger Ring sogar schon bei der mildesten Methylirung geöffnet wird; ein solcher ist aber beim Graminin vorhanden. Diese Frage ist hier also ebensowenig geklärt wie bei der Stärke.

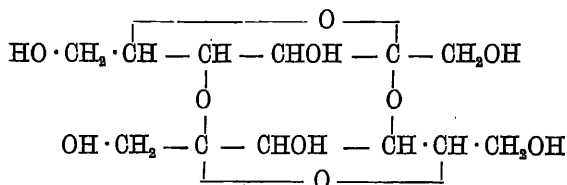
Abweichende Polylaevane. Das einfache Sinistrin haben wir besprochen; hier noch einige Worte über einige andere. Wie oben erwähnt, gibt es nur noch wenige selbständige Stoffe, so Irisin und Graminin; die anderen angegebenen sind wohl sämtlich Gemische mit irgend welchen Abbaustufen.

Irisin liefert nach SCHLUBACH 62) bei der Spaltung aequivalente Mengen von Tetramethyl-fructose und Dimethyl-fructose. Der Abbau verläuft über ein Di-Irisan, ein Tetrafructose-anhydrid (Molg. 642), dann weiter über ein Difructose-anhydrid → Fructose. Das

---

56) ***J. W. Irvine, T. N. Montgomery,*** Methyl. and const. of inulin. Jl. Amer. Chem. Soc., **55**, 1988 (1933). — 57) ***E. Bourquelot, M. Bridel,*** Rech. du glucose à l'ét. d. prod. de l'hydrol. ferm. de l'inuline. C. R., **172**, 946 (1921). — 58) ***H. Pringsheim, J. Reilly,*** Inulin X. Ber. Chem. Ges., **63**, 2636 (1930). S.A. — 59) ***R. Weidenhagen,*** Enzym. Spalt. des Inulins durch β-h-Fructosidase. Zs. V. D. Zuck., **82**, 316, 912 (1932). S.A. — 60) ***H. Pringsheim, P. Ohlmeyer,*** Inulin XII, XIII. Ber. Chem. Ges., **65**, 1242, **66**, 1292 (1932/3). — 61) ***H. H. Schlubach, H. Schmidt,*** Ident. des Inulins aus verschied. Pflanzen. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **520**, 43 (1935). — 62) ***H. H. Schlubach, H. Knoop, Mao Yin Liu,*** Irisin I, II. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **504**, 30, **511**, 140 (1933/4).

Difructose-anhydrid liefert eine Trimethylfructose, die nicht der des Inulins entspricht (1,3,6 oder 1,4,6; je nachdem die Dimethyl-fructose 3,6 oder 4,6 ist, was noch nicht sichergestellt). Das Difructose-anhydrid hat also die Formel:

```
               ┌───────────── O ───┐
               │                   │
HO · CH₂ · CH — CH — CHOH — C — CH₂OH
                    │              │
                    O              O
                    │              │
    OH · CH₂ — C — CHOH — CH · CH · CH₂OH
               │                 │
               └────── O ────────┘
```

und bindet sich mit je einer CH_2OH-Gruppe an eine weitere Fructose zum Di-Irisan, so daß es bei Aufspaltung dieser Bindungen als Zwischensubstanz zurückbleibt. Die Molgröße steht noch nicht fest. Nach v. Euler (l. c. 4) soll das Acetat (kryoskopisch) weniger als 9 Fructosen haben, das aus dem Acetat regenerirte aber 18 (Molg. 3200); Diffusionsmessungen ergaben ein Micellgewicht von ca. 10.000; Colin (l. c. 8) gibt 7—8 Fructosen an.

Graminin ist nach Schlubach **63)** einheitlich ein Fructan, $[\alpha]_D^{20} = -40{,}0$, aus Roggenmehl mit 70%igem Alkohol; enthält 9—10 Fructosen. Spaltung liefert dieselbe Tetra- und wahrscheinlich dieselbe Trimethyl-fructose wie Inulin, ferner eine Dimethyl-fructose, im Verhältnis 2 : 1 : 2. Graminin enthält wahrscheinlich einen großen Ring von 1 nach 10.

Verwandt damit sind endlich die **Laevane.** Das „Gummilaevan" hatten Hibbert c. s. **64, 65)** aus dem Produkt isolirt, das der *Bac. mesentericus vulgatus* und *subtilis* aus Saccharose bildet (vgl. Beyerinck, H.W. S. 567, *l. c. 271*). Sie haben es auch bereits näher untersucht, indem sie eine kristallisirte 1,3,4-Trimethyl-fructofuranose und dieselbe Tetramethyl-verbindung erhielten wie aus Saccharose. Seine Ketten sind also, im Gegensatz zu den 1,2-Ketten des Inulins, in 2,6-Bindung. Nach Haworth **66)** enthält es (durch Methylirung bestimmt) 10—12 Fructosen. Jodzahl und Viscositätsmessungen ergeben aber die doppelte Länge. Dasselbe Laevan **(66)** konnte aus *Poa pratensis, Gramineae* (Rispen-gras) isolirt werden.

2) Inulasen.

§ 412. Über das Ferment an sich ist wenig gearbeitet worden; es ist auch heute noch sehr mangelhaft bekannt, wie dies für alle Polyasen außer der Amylase gilt. Die Enzyme sind bisher alle nur in recht schwach wirksamem Zustande hergestellt worden; sie scheinen im grunde alle überwiegend Desmo-enzyme zu sein. Das einzig wichtige Ereignis seit Erscheinen des H.W. war die Anzweifelung der Eigenexistenz des Enzyms durch Weidenhagen **67)** (l. c. 59), der zur weiteren Vereinfachung der Specifität auch die Wirkung der Inulase einfach auf die der β-h-Fructosidase, der Saccharase zurückführen will (§ 300).

Weidenhagen gab an, daß aus Hefe dargestellte Saccharase Inulin quantitativ in Fructose aufspaltet, allerdings sehr langsam: die Reaktionsgeschw. Saccharose: Inulin verhalten sich wie ca. 6000 : 1; ähnlich bei Autolysesaft aus Hefe. An sich wäre eine solche gewaltige Verschiebung der relativen Specifität nicht unmöglich, denn ähnlichen Differenzen ist ja auch Helferich bei seinen Glykosid-studien begegnet; aber für natürliche Substrate unterliegt

---

63) ***H. H. Schlubach, K. Koenig,*** Graminin. Ann. Chem. Pharm. (Liebig), **514,** 182 (1934). — 64) ***F. C. Harrison, H. L. A. Tarr, H. Hibbert,*** Synth. of polysacch. by bact. Canad. Jl. Res., **3,** 449 (1930) (Lit.) — 65) ***H. Hibbert, St. Tipson, F. Brauns,*** Const. of levan etc. ibid., **4,** 221 (1931). (Vorl. Mitt. Jl. Am. Chem. Soc., **52,** 2582.) 66) ***S. W. Challinor, W. N. Haworth, E. L. Hirst,*** Const. and chain length of levan. Jl. of Chem. Soc., **1934,** 676, 1560. — 67) ***R. Weidenhagen,*** Enzym. Spalt. des Inulins. Naturwiss., **1932,** 254.

sie an sich schon schweren Bedenken. Aber das Hauptargument gegen diese Vereinheitlichung ist natürlich die Tatsache, daß ja andere Zellen als Hefe, nämlich Schimmelpilze, eine kräftig wirkende specifische Inulase produciren. W. sieht das natürlich selbst und versucht es auf die Wirkung besonderer Aktivatoren zu beziehen, die er aber noch nicht aufgefunden hat. So ist es also vorläufig einfacher, anzunehmen, daß der von ihm beobachtete Zerfall des Inulins auf eine spontane Zerlegung durch Säure beim opt. ph der Hefesaccharase (4,6) zu beziehen ist; denn wie HAWORTH (l. c. 52) exakt gezeigt hat, ist Inulin schon gegen winzige Mengen Säure, schon gegen kohlensäurehaltiges Wasser empfindlich. Es ist ja nicht nötig, eine vollständige Hydrolyse des Inulins auf diesem Wege ins Auge zu fassen; es genügt vielmehr eine partielle Zerlegung zu niederen Polylaevanen („Inulin-dextrinen"); denn daß diese z. T. — bei natürlichem Vorkommen — durch Saccharase zerlegt werden können, ist zweifellos (SCHLUBACH 68)); andererseits ist eben ein Zerfall bis zu diesen Stufen durch die Acidität der Saccharase-lösung durchaus wahrscheinlich; im übrigen ist damit bereits von IWATSURU 69) der schwache Angriff von Acetonhefe auf Inulin erklärt worden, bei dem er solche reducirenden Zwischenstoffe mit Wahrscheinlichkeit nachweisen konnte (vgl. dazu auch den Angriff von Inulin durch Hefen, GRAFE (*l. c. 781*). Lebende Hefen fand aber WEIDENHAGEN völlig ohne Wirkung). Andererseits gibt W. ausdrücklich an, daß er keine reducirenden Zwischenstufen nachweisen konnte, wenigstens keine vergärbaren. Bei Unterbrechung der Hydrolyse und Vergärung der Fructose war der Rückstand stets frei von Reduktion. Der Sachverhalt ist also noch nicht klar; aber nach den grundsätzlichen Ergebnissen von GRASSMANN c. s. 70), daß überall die Polyosen zerlegenden Enzyme ihre Specifität nur auf längere Ketten richten, daß also die parallele Behauptung W.'s von der Identität von Cellulase und Cellobiase nicht zutrifft, werden wir wie dort damit zu rechnen haben, daß Saccharase und Inulase zwar nahe verwandt, aber nicht voll identisch sind. Vielleicht haben sie dasselbe Agon auf etwas verschiedenen Trägern.

Auch Irisin wird von Inulase, und nur von dieser gespalten (COLIN, l. c. 8). Nach WEIDENHAGEN 71) spaltet Saccharase aus Unterhefe quantitativ auf; aber mit sehr geringer Geschwindigkeit, im Verhältnis zu Saccharose nur 1 : 400 000. Es gelten hier also dieselben Erwägungen wie beim Inulin, aber noch verstärkt, denn solche Verschiebungen der relativen Spezifität bei einem Enzym sind noch nicht beobachtet worden.

Weitere Versuche zur **Reinigung des Ferments** (PRINGSHEIM, H.W. Bd. III, S. 912) liegen von PRINGSHEIM (l. c. 60) vor. Rohextrakt aus Massenkulturen von *Aspergillus niger*. Vollständige Adsorption der I. an Al-hydroxyd B bei ph = 3,8. Elution mit Phosphatpuffer bei 6,8 oder Zusatz von schwacher NH_3-Lösung ebenfalls bei ph = 6,8 (weniger Ausbeute, reineres, salzarmes Enzym). Dieses Enzym zerlegt reines Inulin quantitativ und zwar nach WEIDENHAGEN 67) in reine Fructose, während nach PRINGSHEIM auch Glucose entsteht (l. c. 60).

Inulase-Einheit diejenige Menge Enzym, die in 3 h bei 37° 150 mg Inulin in einproz. Lösung zu 30 % spaltet. — WEIDENHAGEN lehnt diese neue Einheit ab und empfiehlt seine den WILLSTÄTTER-KUHN'schen Einheiten angepaßten Einheiten unter „Normalbedingungen".

Zur Methodik gibt SREENIVASAYA 72) an, daß dilatometrische Verfolgung des enzymatischen Abbaus je mMol. entstehender Fructose eine Volum-verminderung von 7,9 cmm ergibt (bei Stärke nur 3,9).

---

68) ***H. H. Schlubach, W. Flörsheim,*** Polylaevane der Blätter etc. Zs. phys. Chem., **198**, 153 (1931). — 69) ***R. Iwatsuru,*** Polysacch.-Spalt. durch Hefe. Bioch. Zs., **166**, 409 (1925). — 70) ***W. Graßmann, R. Stadler, R. Bender,*** Spez. cellulosespalt. Enz. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **502**, 20 (1933). S.A. — 71) ***R. Weidenhagen,*** Enzym. Spalt. des Irisins. Z. V. D. Zuck. **83**, 1042 (1933). — 72) ***M. Sreenivasaya c. s.,*** Hydrol. of inulin. Proc. Ind. Ac. Sci., **B 1**, 43 (1934); BPh **84**, 648.

Über Einfluß der Milieubedingungen, **Kinetik** etc. ist seit dem H.W. nichts Neues bekannt geworden; auch der **opt. ph** von 3,8 nicht nachgeprüft.

Über das **Vorkommen** des Enzyms liegt kaum Neues vor. PRINGSHEIM **73)** hat die älteren Angaben berichtigt (DEAN, *l. c. 777*), daß *Aspergillus* nur oder vorwiegend (*l. c. 770*) auf inulinhaltigen Nährböden Inulase bildet. Im Gegenteil bildet er am meisten auf Saccharose. Die Enzymbildung nimmt mit der längeren Dauer des Wachstums erst zu, dann (vom 22. Tage) wieder ab.

Die Beobachtungen von BOSELLI (*l. c. 778*), daß *Aspergillus* kaum Enzym abgibt, so lange er jung ist, wohl aber beim Altern, hat COLIN (l. c. 7) bestätigt.

In welchen Kryptogamen außer Schimmelpilzen I. vorkommt, ist nicht weiter untersucht, besonders sind die Angaben LINDNERS (*l. c. 780*) über besondere Inulase führende Hefen nicht nachgeprüft. — Für einen Abbau durch Darmbakterien könnten Versuche von OOTANI **74)** sprechen, daß Kaninchen Inulin (*Dahlia*) gut verwerten, Hunde kaum.

Ebensowenig ist über das Enzym der höheren Pflanzen noch so gut wie nichts bekannt. Das Inulin von *Dahlia* wird durch die darin enthaltene I. sehr langsam angegriffen (OOTANI). Im Ganzen ist also das Enzym erstaunlich vernachlässigt und ein gutes neues Arbeitsfeld.

Bei Tieren, auch Wirbellosen, scheint I. durchaus zu fehlen. Die Angabe von BIERRY (l. c. *782*), daß sie bei *Helix* vorkommt, ist von GRAETZ **75)** und ULLMANN **76)** nicht bestätigt worden; bei *Astacus* fehlt sie nach KRÜGER u. GRAETZ **77)**. Weitere sehr zweifelhafte Befunde bei KRÜGER **78)**.

---

73) ***H. Pringsheim, R. Perewosky,*** Inulinase V. Zs. phys. Chem., **153**, 138 (1926). — 74) ***K. Ootani,*** Ausnutz. von Dahlia-Knollen etc. Okay. Jg. Zasshi (jap.), **41**, 612; BPh **51**, 65. — 75) ***E. Graetz,*** Verdau. Ferm. einheim. Pulmonaten. Zs. phys. Chem., **180**, 305 (1929). — 76) ***T. Ullmann,*** Ferm. ein. Wirbelloser auf polymere KH. Zs. vgl. Phys., **17**, 520 (1932). — 77) ***P. Krüger, E. Graetz,*** Ferm. des Flußkrebs-Magensaftes. Zool. Jb., **45**, 463 (1928). S.A. — 78) ***P. Krüger,*** Ferm. Stoffw. der nied. Tiere. Erg. Phys., **35**, 538 (1933). S.A.

B. Glucanasen.

I. Glucane: Cellulosen und Lichenin.

§ 413. Bei der Ergänzung dieser Abschnitte des H.W. sind einige Umstellungen und Begriffsverschiebungen notwendig. Ich hatte im H.W. noch das Lichenin zu den „Hemicellulosen" gestellt und demzufolge auch die Lichenase ganz von der Cellulase abgetrennt, trotzdem hierdurch schon Schwierigkeiten erwuchsen. Nunmehr ist es aber sicher geworden, daß die Lichenase mit der eigtl. Cellulase in eine Gruppe gehört, wenn nicht überhaupt beide Enzyme identisch sind und die noch verbliebenen geringen Differenzen auf kleine Unterschiede in den Substraten zurückzuführen sind. Jedenfalls muß man also nunmehr beide in engen Zusammenhang behandeln, etwa wie Cellobiase und Gentiobiase.

Dieser Umschwung ist vor allen Dingen dadurch herbeigeführt worden, daß es nicht mehr möglich ist, eine Enzymgruppe, die „echte", d. h. unlösliche genuine Cellulose angreift, eine „Cellulase", zu trennen von einer, eben vor Allem durch die „Lichenase" vertretenen, Enzymgruppe, die dies nicht vermag, sondern nur leichter zugängliche — umgefällte oder teilweise abgebaute — Cellulosen angreift, also neben Lichenin auch andere natürliche Reserve-cellulosen (sog. Hemicellulosen). Denn Karrer hat grade für die „Lichenase" (aus *Helix*) gezeigt, daß ein genügend kräftiges Ferment auch unlösliche natürliche Cellulose (Filtrirpapier u. dgl.) total aufspaltet; und analoge Beobachtungen haben Grassmann c. s. an dem Enzym von *Aspergillus oryzae* gemacht. Es gibt also keine gruppenmäßig verschiedenen Enzyme Cellulase, Lichenase, Hemicellulase (im älteren Sinne); sie sind vielmehr gruppenidentisch.

Auch die Substrate stehen sich sehr nahe, wenn auch gewisse Unterschiede zweifellos vorhanden sind. Zum mindesten ist das kolloidal wasserlösliche Lichenin geringer associirt, resp. aus kürzeren Ketten bestehend; ob Strukturunterschiede vorhanden sind, ist noch nicht bekannt. Da es auch sonst noch allerlei Stoffe gibt, die der „echten" Cellulose nahestehen, ohne mit ihr voll identisch zu sein, möchte ich vorschlagen, als für dieses Werk vom enzymtypischen Standpunkt aus am geeignetsten, alle diese durch dieselbe Gruppe von Enzymen (oder dasselbe Enzym) angreifbaren, nur aus β-Glucose aufgebauten Polyosen mit Karrer als Glucane zu bezeichnen, und die dazu gehörige Gruppe von Enzymen als Glucanasen (α-Glucane und die dazu gehörigen Enzyme sind ja als „Stärke" und „Amylasen" genügend genau unterschieden).

Man kann dann natürlich, wie Staudinger 79) vorschlägt, die Glucane weiter genauer bezeichnen, als Celloglucane, Lichenoglucane etc. Sind ihre Endgruppen frei, wie man bei den Naturstoffen vorläufig anzunehmen hat, und wie es bei den reducirenden Abbauprodukten sicher ist (s. u.), so bezeichnet sie St. als „Poly-glucan-dihydrate", also z. B. Polycelloglucan-dihydrate; sind die Endgruppen acetylirt, als Polyglucan-acetate etc.; dann kann

---

79) ***H. Staudinger c. s.,*** Cellulose. Ber. Chem. Ges., **63**, 2308 (1930). S.A.

man noch die freien Hydroxyle (hier 2, 3, 6) angeben und den Polymerisationsgrad. So ist also eine partiell abgebaute „Acetyl-cellulose" nach ST. genau zu präcisiren als z. B. 50 Poly-triacetyl-cello-glucan-diacetat.

Ich schlage also vor, alle die aus β-Glucose aufgebauten Stoffe um die Cellulose herum enzymtypisch zusammenzufassen, also neben der „echten" wandbildenden Cellulose auch die „Reservecellulosen"; und diese letzteren somit herauszunehmen aus der historischen Gruppe der **„Hemicellulosen"**, in deren Begriffsbestimmung und Beschreibung eine unheilvolle Verwirrung *) herrscht. Ich nenne also künftig „Hemicellulosen" nur noch solche Polyosen, die andere Zucker als Glucose oder Fructose enthalten; nur weil der Name als solcher unausrottbar ist. An sich wäre er überflüssig: man könnte sich ohne Weiteres damit begnügen, Mannane, Galactane und Pentosane von den Glucanen zu unterscheiden, und danach die Enzyme zu benennen.

Ich möchte aber diesen mit einem mißleitenden Klang an „Cellulose" erinnernden Namen möglichst in den Hintergrund stellen und schlage deshalb vor, für die zu den Polyosen mit anderen Zuckern gehörigen Fermente den alten Namen **Cytasen** beizubehalten, neben dem „Hemicellulasen" nur als Synonym zulässig bliebe. Die Enzyme welche die Polyosen mit Gehalt an Uronsäuren spalten, sind ja immer gesondert behandelt worden, ich werde sie hier neu bezeichnen als **Polyuronidasen**. Dagegen habe ich vorläufig die isolirt stehende Gruppe der **Chitinasen** zu den Glucanasen gestellt, weil mir die Verwandtschaft der Substrate genügend groß zu sein scheint, wenn auch bei gleicher Bindungsart anstelle der β-Glucose die 2-Aminoglucose (als Acetyl-glucosamin) als Kettenglied getreten ist; anderenfalls hätte man für diese kleine Gruppe einen Hauptabschnitt neu bezeichnen müssen. Es ist dazu nur noch zu bemerken, daß die β-Bindung im Chitin noch nicht sichergestellt ist.

Wir haben es also zunächst mit den Glucanen zu tun, also den Polyosen, die als nur aus Ketten von β-Glucose bestehend sich um die beiden Hauptvertreter herum gruppiren, die echte wandbildende Cellulose und das Lichenin als Typus der dem Stoffwechsel zugänglichen Reservecellulosen. Hierbei muß nun eine wesentliche thematische Beschränkung kurz begründet werden. Wir haben bei der Stärke und in gewissem Sinne auch noch bei den Fructanen die **Strukturfragen** sehr eingehend behandelt, einschließlich der Depolymerisirungen zu Hexosanen u. dgl. Hier erschien mir dies unbedingt notwendig, auch für ein Fermentwerk, weil eben ein Verständnis der Wirkung der Amylasen nicht eher möglich ist, ehe nicht die Geheimnisse um den feineren Bau der Stärke — oder der verschiedenen Stärken — geklärt sein werden. Wir haben also diese Erörterungen der Schilderung der Fermente als solcher vorausgeschickt und haben trotzdem noch bei dem eigentlichen Fermentkapitel immer wieder Strukturfragen behandeln müssen. Dies zur Begründung, warum wir die Stärkeprobleme so eingehend behandelt haben.

Beim Inulin war es schon weniger wichtig, und bei der Cellulose ist es überflüssig. Was am feineren Bau der verschiedenen Cellulosen noch unklar ist, ist für unsere Darstellung, also enzymtypisch, fast ohne Belang. Alles, was wir für den enzymatischen Abbau zu wissen benötigen, wissen wir tatsächlich. Es gibt da eigentlich nur die eine einzige Ausnahme des Lichenins. Hier besteht noch die Möglichkeit, daß Lichenin einen etwas anderen Bau hat als Cellulose, und somit ein nahe verwandtes, aber doch leicht verschiedenes Enzym

*) Eine auch nur halbwegs brauchbare Definition, was Hemicellulosen sind, gibt es nicht. Sie sind weder physiologisch — als Reservesubstanzen gegenüber Membranstoffen — noch chemisch präcisirt. Eine der üblichsten „Definitionen" rechnet alles zu den Hemicellulosen, was in Alkali löslich ist; dann sind neben allerlei Polyosen auch noch Polyuronide mit einbegriffen (s. z. B. O'DWYER 80)), s. a. § 419.

80) ***M. H. O'Dwyer***, Hemicelluloses IV. Biochem. Jl., **20**, 656 (1926).

den Abbau katalysirt; aber grade über diesen einen enzymtypisch wichtigen Punkt wissen wir so gut wie nichts. Was sonst an Problemen noch um die Cellulose herum vorliegt, sind an sich Fragen von höchster Wichtigkeit. Es handelt sich um die Kettenlänge und somit um den Molekülbegriff und die zur Ausbildung der voll kolloiden Cellulose wirksamen Kräfte; es handelt sich um die Beziehungen zur Faserstruktur ebensowohl im technischen Sinne wie im biologischen, und manche anderen Fragen. Aber enzymtypisch ist von allen diesen Fragen nur eine einzige von Bedeutung, nämlich die nach dem generellen Mechanismus des Angriffs an diesen Faserstoffen. Und grade diese, ob es sich betont um einen permutoiden Angriff an den Kristalliten oder reine adsorptive Oberflächenwirkung handelt, können wir noch nicht genau beantworten. Dagegen sind die feineren Fragen des Aufbaus für die Schilderung des enzymatischen Abbaus hier nebensächlich. Sehen wir also von einer „Lichenase" — die dann wohl auch ähnliche wenig genau charakterisirte Reservecellulosen im Stoffwechsel spaltet — vorerst ganz ab, so wissen wir mit Sicherheit, daß ein Enzym mit einer ganz bestimmten singulären Affinität die langen Ketten angreift und über Zwischenstufen bis zu Gebilden mit geringem Molgewicht aufspaltet, die an der Grenze zwischen Oligosen und „Dextrinen" stehen, bis herunter zur Cellobiose. An dieser und den nächsthöheren Zuckern bis zu C_6 (Cellohexaose) greift dann die Cellobiase an, um das Werk der Zerlegung mit der Ausbildung der β-Glucose zu beschließen.

Wir können hier um so eher von einer genaueren Schilderung der verschlungenen Wege absehen, welche die Cellulose-Chemie in den letzten 10 Jahren gegangen ist, als hier eben die Grundfragen der Struktur mit fast völliger Einhelligkeit weitgehend bereinigt sind. Denn die Differenzen zwischen STAUDINGER und K. H. MEYER-H. MARK, sowie HAWORTH bzgl. der Kettenlänge betreffen ja nicht die Struktur an sich, sondern Fragen, die enzymtypisch ganz nebensächlich sind. Enzymtypisch war nur die eine Frage von größter principieller Bedeutung, ob die Cellulose überhaupt aus Strukturketten besteht, oder aus einem Associat kleiner „Grundkörper"; und diese Frage ist entschieden.

Es ist somit beinahe Alles, was wir in einem Fermentwerk über den Bau der Cellulose zu wissen nötig haben, in den allgemeineren Betrachtungen über den Aufbau der Polyosen überhaupt (§§ 364, 364a) vorweggenommen. Hier sind nur noch wenige Einzelheiten nachzutragen, besonders solche, die eben mit der Art oder Intensität der Fermentwirkung zusammenhängen. Dagegen werden wir uns weder mit den Einzelheiten der Diskussionen über die Kettenlänge und den räumlichen Bau der Cellulose-fasern, noch mit der übergroßen Literatur über die nicht hydrolytische Depolymerisirung mit ihren heute als ziemlich wertlos erkannten Molgewichtsbestimmungen befassen. Wir können uns also auf Weniges beschränken.

Cellulose ist, um es ganz kurz nach §§ 364, 364a zu wiederholen, der Sammelbegriff für eine Anzahl von Stoffen, die in ganz einfacher einheitlicher Weise aus langen Ketten von Cellobiose aufgebaut sind. Die echte native Cellulose hat nach viscosimetrischen Messungen von STAUDINGER **81)** eine Kettenlänge von **750—1000 Glucosen**, bildet also eine polymer-homologe Reihe in diesen Dimensionen. Alle vorbehandelten C., so auch die so viel untersuchten Acetylcellulosen und Kunstfasern, sind verkürzte Ketten; Kunstfasern sind analoge Reihen von 100—250 Glucosen. So gibt STAUDINGER **81a)** z. B. an für Viscose $125 \times C_6 = 20000$, für Kupferseide I. G. $220 \times C_6 = 36000$. Das ist so zu verstehen, daß nicht etwa die Schätzungen der Kettenlänge jeweilig innerhalb dieser Dimensionen unsicher sind, sondern die jeweilige Abart „Cellulose" besteht aus verschiedenen Gemischen von polymer-homologen Körpern innerhalb dieser Dimensionen. Lichenin hat eine Kettenlänge von ungefähr 300 Glucosen (STAUDINGER **82)**).

81) ***H. Staudinger***, Chemie der Cellulose. Naturwiss., **1934**, 797. — 81a) ***H. Staudinger***, ***H. Eilers***, Umwandl. von Cellul. in polymer-analoge Cellul.-triacetate. Ber. Chem. Ges., **68**, 1611 (1935). — 82) ***H. Staudinger***, ***O. Schweitzer***, Viscos. Mess. an Polysacch. etc. Ber. Chem. Ges., **63**, 2317 (1930). S.A.

Abgeschlossen: 16. 1. 36. Ber. Phys. 89, H. 3/4.

Die von HAWORTH c. s. 83) mit rein chemischen Methoden gefundenen wesentlich niedrigeren Werte stehen nach STAUDINGER theoretisch nicht im Widerspruch zu seinen Annahmen; es sind eben untere Grenzwerte in dem Sinne, daß die von HAWORTH chemisch vorbehandelten Cellulosen bereits verkürzte Ketten aufweisen.

HAWORTH hat mit größtmöglicher Schonung eine Acetyl-cellulose hergestellt, in der nach allen bekannten Prüfungen keine Abbauprodukte niederer Art nachgewiesen werden konnten. Diese wurde in eine einheitliche Trimethyl-cellulose übergeführt. Bei deren Hydrolyse entstehen 0,6 % Tetramethyl-glucose, was HAWORTH als einen Durchschnittswert ansieht. Daraus berechnet sich eine Kettenlänge von **100—200 Glucosen**, Molg. 20.000—40.000. Da H. einen geringen Abbau bei seinen Prozeduren selbst annimmt, so kommt er auf ein Molg. der nativen Cellulose zwischen 30.000 und 100.000. Nimmt man die oberste Grenze von HAWORTH (100.000) an, und die unterste von STAUDINGER (120.000), so sind die Differenzen nicht sehr erheblich, viel geringer als bei der Stärke, bei der aber andererseits STAUDINGER selbst mit der Möglichkeit kürzerer Ketten und sekundären Associaten rechnet (82), S. 2325).

Daß mit ganz anderen Methoden einerseits K. H. MEYER und H. MARK, andererseits SCHMIDT 84) zu ähnlichen Werten wie HAWORTH gelangt sind, ist S. 339 ausgeführt.

Demgegenüber kommen KRAEMER c. s. 85) und CLARK 86) zu noch höheren Werten. Die ersteren benutzten die SVEDBERG'sche Methode des Sedimentationsgleichgewichtes und fanden bei in Aceton gelöster Nitrocellulose ein Molg. von 300.000. Da sie aber immer im Mittel etwa 2½fach höhere Werte finden als STAUDINGER, so scheinen sie selbst nicht an reelle Unterschiede in den Ergebnissen, sondern an Unterschiede in der Methode zu glauben; vielleicht mißt man eben bei ihrer Methode etwas ganz anderes als nach STAUDINGER. CLARK fand in besonders vorbehandelten C. (z. B. konz. HCl) mikroskopisch meßbare Kristalle von 1,5 μ Länge und 1,1 μ Dicke, woraus er ein Molg. von ca. 500.000 errechnet.

Die Kettenglieder sind ausschließlich Gluco-pyranosen, wie HAWORTH aus den Ergebnissen der Methylirung (Entstehung von 2,3,6-Trimethyl-gluco-pyranose zu praktisch 100 %) ebenso erschloß, wie FREUDENBERG (l. c. 104) aus der Größe der Hydrolysenkonstante, die bei Glucofuranose-bindungen 1000 mal größer sein müßte.

Auf die überaus wichtigen Aufschlüsse, welche die **Röntgen-Diagramme** für den Aufbau der Cellulose ergeben haben, gehen wir hier nicht ein; s. S. 334. — Hier ist nur für die Frage einer enzymtypischen Substratverschiedenheit kurz zu erwähnen, daß nach HERZOG 87) Lichenin ein anderes Rö-Spektrum hat als Cellulose.

Noch nicht klargestellt ist auch hier die Frage der Kettenenden. Es ist noch nicht einmal sicher, ob absolut reine native Cellulose überhaupt reducirt (vgl. PRINGSHEIM, l. c. 12, S. 356). Der Versuch, bei ihr die Carbonylgruppen am Kettenende durch ihre Reduktionskraft zu messen, ist deshalb schon in den Voraussetzungen zweifelhaft. Die „Kupferzahlen" der verschiedenen Cellulose-Arten haben hier keine Bedeutung. BERGMANN 88) hat auf der Oxydation der Endgruppen mit Hypojodit ein genaues Verfahren aufgebaut, um sie in abgebauten (des-acetylirten) Stoffen zu bestimmen, und daraus das Molg. zu berechnen; dagegen ist diese Methode nach STAUDINGER 89) für die genuine C. nicht zu verwenden, da eben die Endgruppen unbekannt sind. Bei den überaus langen Ketten STAUDINGER's würde ja auch die

---

83) ***W. N. Haworth, H. Machemer,*** Mol. Struct. of cellul. Jl. of Chem. Soc., **1932,** 2270. — 84) ***E. Schmidt c. s.,*** Quant. Best. der Carboxylgruppen von Cell. etc. Ber. Chem. Ges., **67,** 2037 (1934). — 85) ***E. O. Kraemer, W. D. Lansing,*** Mol. weights of cellul. Jl. of Physical Chem., **39,** 153 (1935); BPh **87,** 237. — 86) ***G. L. Clark,*** Macromol. and micelle as struct. units etc. Cold Spring Harbour Sympos. quant. Biol., **2,** 28 (1934). BPh **85,** 456. — 87) ***R. O. Herzog, H. W. Gonell,*** Rö-Spektr. Vergl. von . . . Lichenin mit Cellul. Zs. phys. Chem., **141,** 63 (1924). — 88) ***M. Bergmann, H. Machemer,*** Zwischenprod. der Cellulose-Hydrol. Ber. Chem. Ges., **63,** 316, 2304 (1930). S.A. — 89) ***H. Staudinger, O. Schweitzer,*** Mol.-Größe der Cellulose. ebd., **63,** 3132 (3144) (1930). S.A.

Reduktion der Endgruppe nicht mehr meßbar sein. Bei Annahme einer reellen Reduktion der C. selbst käme man auf ca. 200 Kettenglieder (Freudenberg).

Haworth 83) schließt aus seinen Zahlen betreff. Tetramethyl-glucose nur, daß die Endgruppen frei sind, d. h. kein großer Ring ausgebildet ist. Schmidt 84) aber glaubt sicher erwiesen zu haben, daß C. an den Kettenenden Carboxyle (als Lactone von Aldonsäuren) enthält, und zwar alle C. gleichmäßig 0,28 %; daraus eben kommt er zu einer Kettenlänge von 96 Glucosen. Nach Freudenberg 90) ist das endständige Carboxyl nicht wahrscheinlich: es müßte dann Trimethyl-glucolacton entstehen, das nicht aufzufinden ist; Freudenberg sieht vorläufig kein Argument gegen einen ganz normalen „Zuckerabschluß" der Kette, d. h. ein Halbacetal.

Sehen wir also von diesen beiden noch in der Diskussion stehenden Fragen der Länge der Ketten und der Struktur der Kettenenden ab, so ist jedenfalls die Ansicht aller Forscher, daß die Cellulose aus langen Ketten besteht; die Theorie der kleinen Grundkörper wird nur in gewissem beschränkten Sinne noch immer von Hess 91) vertreten. Es seien deshalb ohne jede Diskussion seine letzten Ansichten angedeutet (seine älteren Arbeiten s. 92)). Der lange Streit um das „Biosan" (vgl. l. c. 12, S. 359) als echten Grundkörper ist insofern entschieden, als Hess 93-95) ihm nun auch die Natur eines Cellodextrins zuschreibt, wenn es auch kryoskopisch die Molgröße eines Disaccharid-anhydrids anzeigt; aber nun soll dieses „Grenzdextrin" neben 1—2 anderen Stoffen das einzige Produkt der Acetolyse sein, kein stufenweiser Abbau erfolgen; die Mischungen dieser 2—3 Stoffe sollen die Reihen von Dextrinen vortäuschen. Die beiden Grenzdextrine sollen insofern die Grundkörper bilden, als sie als solche die eigentliche Inhaltssubstanz der Cellulosefaser darstellen, die sich aus ihnen also rein physikalisch bildet, und zwar durch Vermittlung eines die Innensubstanz umgebenden und einhüllenden Systems aus einer „Hautsubstanz", welche somit die „Bio-Struktur" der Cellulose vermittelt. Die kristallisirte Acetylcellulose II zeigt osmometrisch (isotherme Destillation) ein ganz wechselndes Molgew. Bei einer Konz. von > 0,25 % ist kein osm. Druck nachweisbar; das Molg. ist von 0,25 bis 0,19 = 16 C_6 und geht bei steigender Verdünnung über 8 C_6 nach 2 C_6, weiter nicht; auch das acetylirte Grenzdextrin I zerfällt bis auf 2 C_6, sogar schon bei < 0,2 % (95), und < 0,1 bis zu 1 C_6. Ähnlich verhält sich auch technische Acetylcellulose (Cellit). Hess glaubt hier wie früher eine echte „Depolymerisirung" bei der Verdünnung zu sehen. Im übrigen sind nach seinen eigenen Angaben die Verhältnisse überaus verwickelt, wie auch aus anderen hier nicht citirten Arbeiten hervorgeht. Wir können darauf nicht weiter eingehen. Hess steht also kurz gesagt auf dem Standpunkt, daß nicht die langen Moleküle und nicht die Micelle Meyer-Mark's die Faser an sich sind, sondern daß das rein chemische Substrat der Faser immer relativ einfache „Grundkörper" sind, eben die Inhaltssubstanz, während die „Faser" ein rein morphologisch zu betrachtendes Gebilde ist; sie hat eine Bio-Struktur und ist, da periodisch gewachsen, inhomogen.

Freudenberg 96) lehnt die ganze Sache ab, die Trennung von Hautsubstanz und Inhaltssubstanz ist nicht nachzuweisen. — Für die Bewertung osmotischer Daten ist wichtig die Feststellung von K. H. Meyer 97), daß bei Kettenmolekülen in Lösungen verschiedene Teilstücke einigermaßen selbständige Brown'sche Bewegungen ausführen, und derart fast wie selbständige Teilchen wirken können; dies kommt durch Wärmestöße aus der Umgebung zustande, die Rotation um die C-C-Achse und Deformations-Schwingungen der C-C-Bindung bewirken. Diese Abweichungen des durch Dampfdruck bestimmten vom chemisch genau bekannten Molg. zeigen sich schon bei Fadenmolekülen wie Oleyl-oleat u. dgl. bei Molg. von 5—800; die gemessenen „Molgewichte" sind erheblich zu klein.

Abbau der Cellulose. Auch diese Frage kann hier nur ganz oberflächlich gestreift werden, wieder nur insoweit, als wir die Grundlagen für das enzymtypische Verhalten der Cellulose gebrauchen. Sonst muß auf die umfassenden Specialwerke (S. 328) verwiesen werden. Die Verhältnisse werden allein schon dadurch so verwickelt, daß ja alle

---

90) ***K. Freudenberg,*** Chemie der Stärke etc. (Vortrag). Ang. Chemie, **1934,** 675. S.A. — 91) ***K. Hess,*** Morphol. und Chem. bei den org. hochmol. Naturst. Naturw., **1934,** 469. — 92) ***K. Hess,*** Chemie der Cellulose. Leipzig 1928. — 93) ***K. Dziengel, C. Trogus, K. Hess,*** Cellulose u. Cellulosedextrine. Ann. Chem. Pharm. (Liebig), **491, 52** (1931), **501,** 49 (1933). — 94) ***E. Garthe, K. Hess,*** Mol. Gew. Best. in Eisessig (Cellulose). Ber. Chem. Ges., **64,** 882 (1931). — 95) ***K. Hess, M. Ulmann,*** Molgew. der krist. Acetylcellulose. Ann. Chem. Pharm. (Liebig), **504,** 81 (1933); Ber. Chem. Ges., **67,** 2131 (1934), **68,** 134 (1935). — 96) ***K. Freudenberg,*** Fortschr. auf dem Gebiet der Polysacch.-Chemie. Chem. Ztg., **1935,** 505. — 97) ***K. H. Meyer, R. Lühdemann,*** Verh. höher molek. Verb. in Lösung. Helv. Chim. Acta, **18,** 307 (1935).

Angriffe auf die Cellulose an dem festen Substrat ansetzen, also nicht wie bei der Stärke — wenigstens dem Hauptzuge nach — an dem kolloidal gelösten Substrat, d. h. durch Reaktion im mikroheterogenen System. Bei der Cellulose sind es also ausschließlich Reaktionen an den makroskopischen Oberflächen der Kristallite, und hier gibt es von vornherein zwei Reaktionstypen. Einerseits die permutoide Reaktion, bei der der ganze Kristall reagirt, ohne sein Gefüge zu verlieren, weil die Hauptvalenzketten nicht mit hineingezogen werden; es ist also so, „als ob" es sich um eine Reaktion im homogenen System handelte, es sind „quasi-homogene" Reaktionen, wie sie bei der Cellulose betont in betracht zu ziehen sind (s. z. B. MARK und MEYER **98)**). Außer diesem kommt auch ein anderer Reaktionstypus in Frage, die reine durch Adsorption vermittelte micellare Oberflächenreaktion, z. B. an den Hydroxylgruppen (K. H. MEYER). In vielen Fällen ist es noch nicht entschieden, wie der Vorgang überhaupt ansetzt; während wie gesagt MARK u. MEYER die permutoide Reaktion als die viel häufigere ansehen, nimmt HESS **99)** für die so überaus wichtige Acetylirung eine heterogene, reine micellare Oberflächenreaktion an. Da diese Grundlage aber entscheidend ist für die theoretische Auswertung vieler Befunde, z. B. kinetischer Messungen des Abbaus, so ist einerseits die Deutung vielfach noch unsicher; andererseits geben die verschiedenen Angriffsmöglichkeiten bei der Cellulose Gelegenheit zu den verschiedenartigsten Abbauvorgängen. Besonders wichtig erscheint die Frage nach dem primären Reaktionstypus beim enzymatischen Angriff (s. u.).

Der Abbau der C. mit rein chemischen Mitteln kann sehr wechselvoll verlaufen. Es gehen z. B. mit starken Säuren Kettenlösung, Freilegung von reducirenden Gruppen, Oxydationen u. dgl. vor sich, die zunächst zu technisch wichtigen noch hochmolekularen Massen führen, wie Hydrocellulose, Oxycellulose u. dgl. Bei dem rein und energisch durchgeführten **hydrolytischen Abbau** entsteht Glucose; ebensowohl mit überkonz. HCl (WILLSTÄTTER, BERGIUS), wie mit verdünnter Schwefelsäure (SCHOLLER). Zu 100% ist Glucose so nicht zu erhalten, da Reversionsprodukte entstehen. Der Beweis, daß C. nur Glucose enthält, ist von IRVINE geführt worden, durch Spaltung des Triacetats mit methylalkoh. HCl (l. c. 12, S. 91). Wasserfreies HF führt nach HELFERICH **100)** durch Ausbildung von Reversionsprodukten zu hochmolekularen Stoffen mit völlig veränderter Struktur, unangreifbar durch Enzyme, dem Cellan.

Dieser hydrolytische Abbau vollzieht sich über höhere Zucker und Cellobiose. Dies gilt nicht nur für den enzymatischen Abbau und den durch Acetolyse (s. u.); sondern auch bei chemischer Hydrolyse. WILLSTÄTTER **101)** fand Cellobiose beim Abbau mit überkonzentrirter HCl neben Glucose und höheren Oligosen, die dann von ZECHMEISTER **102)** genauer als Tri-, Tetra- und Hexastufen beschrieben wurden (s. u.); daneben entstehen noch höhere Stufen (Dextrine).

Abbau durch Acetylirung. Wenn man in C. vorsichtig Acetylgruppen einführt, so erhält man die Tri-acetyl-cellulose mit zunächst unveränderter (oder fast unveränderter) Kettenlänge, wie HAWORTH (l. c. 83) annimmt, oder schon mit stark verkürzten Ketten, wie STAUDINGER annimmt; jedenfalls ist sie noch hochmolekular in demselben Sinne wie Cellulose selbst es auch ist; es ist also nur ein Teil des Streites

---

98) ***H. Mark, K. H. Meyer***, Bau des krist. Anteils der Cell. II. Zs. physikal. Chem. B **2**, 115 (1929). — 99) ***K. Hess, C. Trogus***, Reaktionsweise der Cell. Zs. physikal. Chem., B **15**, 157 (1931). — 100) ***B. Helferich c. s.***, Einw. von HF auf KH. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **476**, 150, **494**, 101 (1929—1932). — 101) ***R. Willstätter, L. Zechmeister***, Hydrol. von Cellulose. Ber. Chem. Ges., **62**, 722 (1929). — 102) ***L. Zechmeister, G. Tóth***, Hydrol. von Cellul. etc. ibid., **64**, 854 (1931).

zwischen den Anhängern der Kettentheorie und HESS, wenn dieser, wie oben (l. c. 95) angedeutet, ihr auch bei Verdünnung in Eisessig niedere Molgewichte zuschreibt, während sie in konzentrirteren Lösungen auch nach HESS keinen osmotischen Druck erkennen läßt. An diesem Produkt hat HAWORTH seine chemischen Feststellungen über die Kettenlänge gemacht.

Ganz anders ist das Problem der energischeren Einwirkung von Essigsäure-anhydrid, wobei die Acetylgruppen auch die Ketten aufsprengen, eine Acetolyse erfolgt. Als Endprodukt entsteht auch hier Acetylglucose, aber die letzte Vorstufe, Okta-acetyl-cellobiose, ist in reichlicher Menge zu fassen. Die Ausbeute würde theoretisch maximal ca. 30 % sein, wenn keine Cellobiose auskristallisirte, und ca. 70 %, wenn sie maximal durch Auskristallisiren geschützt würde; in Wirklichkeit beträgt die Ausbeute ca. 50—60 % (FREUDENBERG **103—106**)) (Beweis für die Gleichförmigkeit der Ketten, S. 336). Auch FRIESE u. HESS **107**) fanden ca. 50 %. Bei Tunicin fand ZECHMEISTER (l. c. 119) 21 %. Die Berechnung gilt (für jede Spaltung) nur für homogene Systeme; bei der Hydrolyse der festen C. etwa nach SCHOLLER im makroheterogenen System liegen ganz andere Verhältnisse vor, was wichtig zu beachten ist für die Enzymspaltung (s. u.).

Es läßt sich aber bei diesem acetolytischen Abbau — analog dem hydrolytischen Abbau der Stärke — verfolgen, daß er in langsamen Etappen vor sich geht, über Poly-celloglucane (resp. deren Dihydrate), wie STAUDINGER (l. c. 79) sie nennt. Die Acetylirung ist ja nach STAUDINGER von Anfang an eine „Verkrackung" gegenüber der Annahme von HAWORTH, daß sie die Ketten (praktisch gesprochen) intakt läßt. (Auch in SCHWEIZER'scher Lösung wird C. allmählich abgebaut, worauf hier nicht einzugehen ist.)

BERGMANN und MACHEMER (l. c. 88) haben durch Abbau von Acetyl-cellulose (mit Eisessig-HBr) mehrere „Acetyl-saccharide" erhalten, die nach der Reduktionskraft bestimmt (nach Abspaltung des Acetyls) 7—13 Glucosen enthalten. (Es handelt sich um die Substanzen, die man früher nach BERGMANN und HESS als „Cellobiose-anhydride" bezeichnet hatte) STAUDINGER (l. c. 89) stellte bei Benützung derselben Methode fest, daß beim Auswaschen mit Wasser aus diesen Gemischen die niedermolekularen Glieder entfernt werden, so daß die des-acetylirten Produkte höhere Molg. ergeben als die Acetylkörper selbst. STAUDINGER hat durch Vergleich der Viscosität mit der Reduktionszahl gezeigt, daß beim Abbau ganze Reihen von polymerhomologen Abbauprodukten entstehen, so in einer Tabelle von 139 bis zu 32 Glucosen, in anderen Versuchen (**108**) bis zu ca. 150 Glucosen. Das vielumstrittene HESS'sche „Biosan" gehört, wie ja HESS nun selbst annimmt, zu diesen Dextrinen (FREUDENBERG **113**)).

Einen andersartigen Abbau der Acetylcellulose beschreiben PRINGSHEIM c. s. **109**). Beim Kochen einer Chloroform-lösung mit Benzolsulfonsäure entstehen 2 Stoffe, A und B. A hat das Röntgen-Spektrum der alkalilöslichen Cellulose, B hat eine Teilchengröße von etwa 1880; Säurespaltung und enzymatische Spaltung ergeben 100 % Glucose. Das Triacetat „dispergirt" in Eisessig als Glucose-anhydrid.

Höhere Oligosen. In jedem Falle des Abbaues, Hydrolyse wie Acetolyse, lassen

---

103) ***K. Freudenberg***, Cellulose. Ber. Chem. Ges., **54**, 767 (1921). — 104) ***K. Freudenberg, W. Kuhn c. s.***, Hydrol. der Polysacch. ibid., **63**, 1510 (1930), **65**, 484 (1932). — 105) ***K. Freudenberg***, Chem. of cellul. etc. (Vortrag). Jl. of Soc. Chem. Ind., **50**, 287 (1931). S.A. — 106) ***K. Freudenberg, K. Soff***, Acetolyse der Cellul. Ber. Chem. Ges., **66**, 19 (1933). — 107) ***H. Friese, K. Hess***, Cellobiosebildung, Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **456**, 38 (1927). — 108) ***H. Staudinger, H. Freudenberger***, Mol. Gew.-Best. an Acetylcell. Ber. Chem. Ges., **63**, 2331 (1930). S.A. — 109) ***H. Pringsheim c. s.***, Neuer Abbau der Cellulose. Ber. Chem. Ges., **61**, 2019 (1928); Cellulosechemie, **11**, H. 7 (1930). S.A.

sich höhere Zucker als Zwischenprodukte fassen, was für die Lehre vom Kettenaufbau natürlich von großer Bedeutung ist.

Am längsten bekannt sind Trisaccharide beim acetolytischen Abbau (IRVINE **110**)); OST **111**) erhielt durch Acetolyse und Entfernen des Acetyls ein Trisaccharid zweifelhafter Natur (vgl. l. c. 92, S. 502); jedenfalls von der Cellotriose ganz verschieden. FREUDENBERG **112**) konnte das Dekamethyl-cellotriosid durch frakt. Destillation rein darstellen, ebenso später (**113**) das Tridekamethyl-cellotetraosid; das methylirte Triosid ebenso HAWORTH **114**) neben höheren Methyl-oligosen. Die Bedeutung dieser Stoffe als wahre Abbauprodukte, d. h. herausgelöste Kettenglieder, geht daraus hervor, daß ihre Drehwerte vom Disaccharid an bis zum Polysaccharid auf einer Graden liegen (FREUDENBERG). Anzweifelung der Einheitlichkeit, Auftreten des Spectrums der Hydratcellulose, angeblicher Zerfall in wäss. Lösung zu Monohexose (**115, 116**). Demgegenüber eindeutige Synthese der methylirten Triose (FREUDENBERG **117**). Neuerdings hat HESS **118**) aber selbst eine auch spektral reine Cellotriose nach kurzer Acetolyse hergestellt, und sie in α und β getrennt; Methylirungsprodukt mit dem von FREUDENBERG identisch.

Bei der Hydrolyse mit überkonz. HCl haben WILLSTÄTTER und ZECHMEISTER (l. c. 101) Cellotriose und Cellotetraose in Substanz dargestellt. ZECHMEISTER (l. c. 102) hat diese Reihe durch die Cellohexaose ergänzt. Auch hier liegen alle Werte (Drehwert, Löslichkeit, Reduktion) auf einer Graden; und zwar für die ganze Reihe von C_2 bis zur Cellulose bzgl. Drehwert und Hydrolysenkonstante (**118a**)).

Die FREUDENBERG'schen methylirten Produkte leiten sich zweifellos von denselben Oligosen ab. Die von OST angegebene Iso-cellobiose existirt nicht. Dieselben Produkte wurden aus Tunicin erhalten (**119**). Anzweifelung der Einheitlichkeit der Cellotriose durch HESS c. s., besonders KLAGES **120**), von ZECHMEISTER **121**) widerlegt; Replik (**122**). KARRER (l. c. 125) erhielt enzymatisch eine Lichotriose.

STAUDINGER (l. c. 108) **123/4**) hat bei voller Würdigung der Bedeutung dieser höheren Oligosen ein Bedenken gegen die Cellohexaose, die ja auch nicht kristallisirt erhalten wurde. Er fand die Viscosität des Acetats nicht in seine Reihe passend und glaubt, daß es sich um eine Pentaose handelt; auf diese stimmen auch direkte Mol-Gew.-Bestimmungen. Bei der Tetraose stimmen die Voraussagen der spez. Viscosität, bei den niederen Gliedern immer weniger, da sie ja nur für fadenförmige Moleküle gelten. Bei ZECHMEISTER stimmen die Werte des Zuckers selbst wie der Peracetate, sowohl aus tierischer wie pflanzlicher Cellulose, auf eine Hexaose. Die Frage, ob Pentaose oder Hexaose, bleibt also vorläufig offen; die Bedeutung dieses höchsten bisher dargestellten niedermolekularen Abbauproduktes für die Struktur der Cellulose wird durch diesen Zweifel nicht beeinträchtigt.

110) ***J. C. Irvine, G. J. Robertson,*** Degrad. of cellulose to an anhydro-trisacch. Jl. of Chem. Soc., **1926**, 1488. — 111) ***H. Ost,*** Isocellobiose und Cellotriose. Zs. ang. Chem., **39**, 1117 (1926). — 112) ***K. Freudenberg c. s.,*** Kristallisirte Methyl-cellotriose etc. Ber. Chem. Ges., **63**, 1961 (1930). — 113) ***K. Freudenberg, K. Friedrich, J. Bumann.*** Cellulose u. Stärke. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **494**, 41 (1932). S.A. — 114) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, H. A. Thomas,*** Isol. of octamethyl-cellobiose etc. Jl. of Chem. Soc., **1931**, 824. — 115) ***Fr. Klages,*** Wasserlösl. Dextrine aus Cellul. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **497**, 234 (1932). — 116) ***K. Hess, M. Ulmann,*** Mol. Größe der Hendeka-methylcellotriose etc. ibid., **498**, 77 (1932). — 117) ***K. Freudenberg, W. Nagai,*** Synth. der methyl. Cellotriose. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **494**, 63 (1932). — 118) ***K. Hess, K. Dziengel,*** Cellotriose. Ber. Chem. Ges., **68**, 1594 (1935). — 118a) ***K. Freudenberg, G. Blomqvist,*** Hydrol. der Cellul. etc. Ber. Chem. Ges., **68**, 2070 (1935). — 119) ***L. Zechmeister, G. Tóth,*** Part. Abbau tier. Cellulose. Zs. phys. Chem., **215**, 267 (1933); sowie Mat. term. Ertes., **50**, 430 (1934) (ungar., Zusf. dtsch.); BPh **81**, 593. — 120) ***F. Klages,*** Bildg. eines . . . krist. KH aus Cellul. Ber. Chem. Ges., **64**, 1193 (1931). — 121) ***L. Zechmeister, H. Mark, G. Tóth,*** Cellotriose etc. ibid., **66**, 269 (1933). — 122) ***K. Dziengel, C. Trogus, K. Hess,*** Cellotriose. ibid., **66**, 276 (1933). — 123) ***H. Staudinger, H. Freudenberger,*** Viscos. Mes. an . . . Oligosacch. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **501**, 162 (1933). — 124) ***H. Staudinger, E. O. Leupold,*** Cellopentaose-acetat. Ber. Chem. Ges., **67**, 479 (1934).

Der **enzymatische Abbau** liefert sowohl bei Cellulose — soweit diese überhaupt angreifbar ist — wie bei Lichenin ausschließlich Cellobiose (natürlich bei Fehlen von Cellobiase). Nur KARRER hat für Lichenin auch eine Lichotriose angegeben (**125**). Wir stehen hier also wieder vor demselben Problem wie bei der Stärke, wie es möglich ist, daß die Säurehydrolyse und die Acetolyse nur die durch die Theorie beschränkten Mengen (maximal 70 %, s. o.) der Biose liefern, während das Enzym tatsächlich 100 % der Biose liefert. Konnten wir bei der Stärke noch mit der Möglichkeit operiren, daß die zu 100% entstehende Maltose ein sekundäres Umwandlungsprodukt aus labilen Zuckerformen ist, so entfällt dies hier von vornherein, denn an der Präexistenz lauter gleichberechtigter Glucopyranosebindungen in 1,4-Stellung ist hier garnicht zu zweifeln. Wir müssen also annehmen, daß die Gesetze der Hydrolyse hier nicht in derselben Form gelten wie dort; FREUDENBERG hat ausdrücklich darauf hingewiesen, daß seine Konstanten und seine Rechnungen nur für Reaktionen im homogenen System gelten, bei dem im Voraus für jegliche Bindung dieselbe Wahrscheinlichkeit des Angegriffenwerdens gilt, und nur die Geschwindigkeitskonstanten für die verschiedenen Arten (bei größeren und kleineren Ketten, Endglieder und Mittelglieder etc.) verschieden sein können. Sie müssen also hier bei den Reaktionen im mikroheterogenen System, oder bei festen Substraten sogar makroheterogenen System, ganz anders verlaufen. Geklärt sind diese wichtigen Fragen im Einzelnen nicht; aber man wird generell annehmen dürfen, daß für das kolloide Enzym wirklich besondere Affinitäten nur zu jeder zweiten β-Glucose bestehen, was um so eher vorstellbar ist, als ja die digonale Schraubung der Faserachse tatsächlich eine besondere Lage jeder zweiten Glucose automatisch zur folge hat. Man kann sich also ganz grob vorstellen, daß das kolloide Enzymsystem nur zu jeder zweiten Bindung Zutritt hat, während die andere räumlich abgeschirmt ist.

Sonstige Glucane. Das **Tunicin** der *Ascidia* unterscheidet sich weder im Röntgendiagramm, noch in den Abbauprodukten von echter Cellulose. Über seine Kettenlänge ist noch nichts bekannt.

Lichenin (*H.W.* § *419*). Wodurch sich das in Wasser kolloidal lösliche Lichenin von der eigtl. Cellulose unterscheidet, ist bisher unbekannt. Es ist bereits erwähnt, daß es nach STAUDINGER (l. c. 79) ein geringeres Molg. hat, ca. 300 Glucosen, und ein anderes Röntgenspektrum. Beim Abbau, auch durch das Enzym, verhält es sich genau wie Cellulose (KARRER, *l. c. 839, 839a*); ebenso bei der Methylirung (**125a**). Die weite Verbreitung des Lichenins hat schon KARRER nachgewiesen. Ihm zum mindesten nahestehend ist wohl auch ein Glucan, das sich in der Fraktion „Hemicellulosen" der Weizenkleie nachweisen läßt und dessen Cu-Verbindung erst durch Aceton aus der wäss. Lösung ausfällt (NORRIS **125b**)); über seine enzymatische Spaltung ist nichts angegeben.

Ein Trisaccharid, Lichotriose, erhielt KARRER **125**) aus Lichenin, nicht Cellulose (l. c. 134, II) neben Glucose mit einem noch sehr wenig Cellobiase enthaltenden Präparat aus *Helix*. Cellobiose war nicht aufzufinden. Eine nähere Untersuchung ist nicht vorgenommen worden.

Bei dem sog. thermischen Abbau durch Glycerol entstehen Produkte, über die sich eine große Diskussion entsponnen hatte, die **Lichosane**, bei denen dieselben Fragen erörtert wurden, wie bei den analogen Abbauprodukten der Stärke (§ 371) und des Inulins, s. PRINGSHEIM **126, 127**).

---

125) ***P. Karrer, H. Lier***, Lichotriose. Helv. Chim. Acta, **8**, 248 (1925). S.A. — 125a) ***P. Karrer, K. Nishida***, Methyl.-Prod. des Lichenin. Helv. Chim. Acta, **7**, 363 (1924). S.A. — 125b) ***F. W. Norris, I. A. Preece***, Hemicell. of wheat bran. Biochem. Jl., **24**, 59, 973 (1930). — 126) ***H. Pringsheim, O. Routala***, (***H. Braun***), Bez. des Lichosans zum Lichenin. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **450**, 255, **460**, 42 (1926/8).S.A. — 127) ***H. Pringsheim, C. Lamm***, Verteil. Zustand des Lichosans etc. Koll. Zs., **54**, 36 (1931). S.A.

Nach BERNER 128) liegen die Dinge tatsächlich im Prinzip ebenso wie dort. z. T. wird das Lichenin einfach in Glycerol gelöst, z. T. alkoholytisch abgebaut zu Produkten vom Molg. ca. 1000—2000, die Alkohol und Glycerol, dieses fest glykosidisch gebunden, enthalten. Es liegt keine Notwendigkeit vor, genauer darauf einzugehen.

Ein sehr schwierig durch Säure hydrolysirbares **Glucan** fand PRINGSHEIM 129) als Gerüstsubstanz der Kohl-arten. Es gibt nach der totalen Hydrolyse — neben Xylose — auch Fructose; es ist nicht bekannt, ob diese im Molekül selbst gebunden, oder als besonderes Fructan beigemengt ist. Über enzymatische Zerlegung keine Angaben. — Röntgen-Diagramm nach Behandlung mit verd. Alkali von dem der Cellulose verschieden. — Ein Glucan der Hefe, das ein Teil der Membranstoffe ist, mit abweichendem Bau (1,3-Ketten) fand ZECHMEISTER 130) *) (vgl. S. 422).

II. Glucanasen (Cellulasen, Lichenasen).

1) Allgemeines; Substrate der Glucanasen.

§ 414. Wir haben uns entschlossen, das früher getrennt behandelte Enzym Lichenase mit der Gruppe der Cellulasen zu vereinigen. Die Identität beider Fermente ist mit denselben Vorbehalten als nunmehr recht wahrscheinlich zu betrachten, wie wir sie immer beim Inanspruchnehmen der Identität mehrerer biologisch getrennter Enzyme machen müssen; aus diesem Grunde sprechen wir bei der Gruppenbehandlung stets von den betr. Enzymen in der Mehrzahl. Aber größere Unterschiede wie etwa zwischen den verschiedenen Saccharasen, oder gar den Amylasen, treten hier auch nicht auf; die „Lichenase" der Schnecken greift auch Cellulose an, und die Cellulase der Schimmelpilze Lichenin. Wenn sich auch nach GRASSMANN c. s. **131—133)** Wirkungsverschiebungen des gleichen Enzympräparates auf Cellulose und Lichenin auffinden lassen, so dürfen wir mit diesen Forschern annehmen, daß diese Unterschiede nicht durch das Enzymsystem, sondern durch die Eigenschaften, vor Allem die Oberflächenbedingungen verursacht sind; denn natürlich bietet die unlösliche Cellulose andere, und zwar weniger günstige Angriffsbedingungen für das kolloide Enzym, als das ebenfalls kolloidal gelöste Lichenin. So ist heute noch nicht sichergestellt, ob das Enzym der Samen „echte" Cellulose angreift, was aber sehr wohl einfach damit zusammenhängen könnte, daß das Samenenzym selbst an größere kolloide Massen — als Desmoenzym — gebunden ist, und deswegen im makroheterogenen Oberflächensystem nur sehr schwach wirkt. Wir sind also berechtigt, die beiden Abarten zusammen zu behandeln.

Es sei hier nur ganz kurz darauf hingewiesen, daß es nicht unwahrscheinlich ist, daß mit den Glucanasen auch die Xylanasen gruppenidentisch sind, ebenso wie es die „Xylosidasen" mit den „Glucosidasen" nach HELFERICH sind (§ 299). Es sprechen zwar einige präparative Befunde gegen, aber allgemeine Erwägungen für diese Gleichsetzung der beiden Gruppen wegen der nahe verwandten Struktur der Substrate. Wir kommen darauf § 420 zurück.

---

*) Anm. Wie mir Herr ZECHMEISTER frdl. mitteilt, hat er die Angaben von SEVAG c. s. (S. 422) nicht bestätigen können.

128) ***E. Berner***, Glycerinabbau des Lichenins. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **500**, 52 (1932). S.A. (Lit.). — 129) ***H. Pringsheim c. s.***, Gerüstsubstanz der Kohlarten. Ber. Chem. Ges., **61**, 2025, **62**, 831, **63**, 664 (1928/30). S.A. — 130) ***L. Zechmeister, G. Tóth***, Polyose der Hefenmembran. Bioch. Zs., **270**, 309 (1934). — 131) ***W. Graßmann, H. Rubenbauer***, Cellulase u. Hemicell. etc. Münch. Med. Ws., **1931**, 1817. S.A. — 132) ***W. Graßmann, R. Stadler, R. Bender***, Cellulosespalt. Enz. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **502**, 20 (1933). S.A. — 133) ***W. Graßmann, L. Zechmeister, G. Tóth, R. Stadler***, Enzym. Abbau der Cellulose etc. ibid., **503**, 167 (1933). S.A.

Substrate der Glucanasen. Den Enzymen zugänglich sind im Grundsatz alle normalen Glucane, d. h. eben die in der 1,4-Bindung aus Cellobiose aufgebauten langen Ketten. Auf diese ist das Ferment spezifisch eingestellt. Es wirkt also ebensowenig auf andere Glucane, die nicht die Cellobiose-Bindung tragen, wie z. B. das der Hefe (l. c. 130) (vgl. S. 422), wie dann, wenn die Ketten zu kurz werden, d. h. auf Oligosen. Die Spezifitätsgrenze liegt nach **133)** bei der Cellohexaose; diese wird noch von Cellulase, aber auch bereits von Cellobiase gespalten (S. 271); die Tetraose, Triose und Biose werden nur noch von Cellobiase, nicht mehr von Cellulase angegriffen. Dagegen scheint es eine obere Grenze der Kettenlänge nicht zu geben. Reine native, also unlösliche Cellulose (Filtrirpapier u. dergl.) wird zwar recht langsam, aber doch beinahe vollständig angegriffen. KARRER (*l. c. 846*) fand dies für *Helix*-enzym; GRASSMANN **132)** für das von *Aspergillus*; bei konz. Enzym bis zu 44 % (in 58 Tagen) (KARRER **134)**); schließlich 93 % bei wiederholter Behandlung mit frischem Enzym (**134**, III)). Hier liegt also ganz offensichtlich keine enzymtypische chemische Resistenz im Molekül vor, sondern eine physikalisch-chemische Behinderung der Oberflächenwirkung in diesem heterogenen System.

Denn auch Lichenin wird schwer angegriffen, wenn man es ohne Sorgfalt trocknen läßt, wobei zusammengeballte Massen entstehen; wohl aber wenn man es durch langsames Entwässern mit Alkohol-Äther als feines Pulver darstellt. Bei allen Glucanen normalen Baus hört diese Resistenz auf, sobald man die ursprüngliche Zusammenballung resp. die Orientirung der Kristallite (KARRER **135)**) (l. c. 154) durch Umlösen aufhebt; das gilt nach **133)** ebenso für die „Hydratcellulose", wie für Tunicin, wie auch die durch *Bact. xylinum* aufgebaute B-Cellulose SCHMIDT's (**136)**); ebenso für die in irgend einer Art (SCHWEIZER'sche Lösung, Viscose etc.) gelöste und wieder ausgefällte Cellulose (KARRER **135)**) und Alkalicellulose. PRINGSHEIM **137)** fand, daß kolloidal lösliche Cellulose nach GUIGNET angegriffen wird, besser noch die nach v. WEIMARN durch Ca-rhodanid löslich gemachte Cellulose. Nitrocellulose verhält sich wie Cellulose (**135**).

Eine besonders eingehende Bearbeitung haben durch KARRER c. s. **138—141)** die Kunstseiden erfahren (*Helix*-ferment), und zwar die Kupferseiden, sowie vor Allem die Viscosen. Die Angreifbarkeit der einzelnen Handelssorten ist sehr verschieden, diese Einzelheiten sind hier ohne Interesse. Im Ganzen ist ausschlaggebend nicht die grobe Zerteilungsform (Dicke der Fäden), sondern die Struktur der Oberfläche. Bei wenig gekerbter glatter Umrandung der Fäden gute, bei stark gelappten schlechte Spaltbarkeit (**138**, II)). Diese Querschnittsbildung hängt von der Natur des Fällungsbades ab: saure Bäder geben glatte Fasern mit ausgeprägter Innenstruktur und Spaltbarkeit bis zu 57 %, salzreiche Bäder Fasern mit gelappten Umrissen, ohne Innenstruktur, Spaltbarkeit ca. 4 %. Die Spaltbarkeit geht parallel mit der Anfärbbarkeit (III); Streckung des Fadens vermindert die Spaltbarkeit; das Grenzflächenpotential (IV) bietet keine Erklärung, vielleicht geringere Deformation der Micelle (**139**). — Analog verhält sich mercerisirte Cellulose, während Reifung und Bleiche nichts ändern; wahrscheinlich wird auch hier das Micell beim Spannen weniger gestört als ohne Spannen (**140**). — LILIENFELD-Seide wird als in saurem Bad gewonnen schnell abgebaut, aber langsamer als BEMBERG-Seide (**141**).

---

134) ***P. Karrer, P. Schubert, (W. Wehrli)***, Enzym. Abbau von Kunstseide und nativer Cell. Helv. Chim. Acta, **8**, 797, **9**, 893, **11**, 229 (1925/8). — 135) ***P. Karrer, H. Illing***, Ferm. Spalt. der Gerüstcell. Koll. Zs., **36**, Erg. Bd., 91 (1925). — 136) ***E. Schmidt, M. Atterer, H. Schnegg***, Quant. Best. von Hexosen etc. Cellulosech., **12**, 235 (241) (1931). — 137) ***H. Pringsheim, K. Baur***, Spalt. von Lichenin und Cell. durch die Ferm. des Gerstenmalzes. Zs. phys. Chem., **178**, 188 (1928). — 138) ***P. Karrer, P. Schubert (W. Wehrli)***, Enzym. Abbau von Kunstseide etc. Helv. Chim. Acta, **8**, 797. S.A., **9**, 893 (1925/6), **10**, 430, **11**, 221 (1927/8). — 139) ***O. Faust, P. Karrer, P. Schubert***, Verh. von Viscose-Seiden zu Schnecken-cellulase. ibid., **11**, 231 (1928). — 140) ***O. Faust, P. Karrer***, Enz. Abbau von Zellstoff etc. ibid., **12**, 414 (1929). — 141) ***P. Karrer, P. Orsi Mangelli***, Verh. der sog. Lilienfeld-Seide gegen Cellulase. ibid. **12**, 989 (1929).

Mit Malzglucanase nach vorheriger Reinigung fand PRINGSHEIM 142) sehr viel geringere Unterschiede der Seiden, auch nicht bei nach der Art der Bäder verschiedener Seiden.

Dies gilt ebensowohl für alle aus Cellulose durch irgend welchen teilweisen Abbau der Ketten erhaltenen Produkte, wenn sie nur echt oder kolloidal löslich werden. Den Angriff von „Dextrinen" hatte bereits v. EULER (*l. c. 795*) beobachtet, und seitdem sind solche Beobachtungen immer wieder bestätigt worden.

Diesen teilweise abgebauten Cellulosen enzymtypisch aequivalent sind nun anscheinend eine große Menge wenig charakterisirter natürlich vorkommender Stoffe, die im Einzelnen noch wenig untersucht sind. Da sie als solche noch nicht rein dargestellt sind, so kann man sie vorläufig nur als dem Lichenin nahestehende „Reservecellulosen" („Hemicellulosen" im älteren Sinne) charakterisiren. Man hat ihren Abbau bisher nur — meist durch Pilze, aber auch bei der Samenkeimung — in situ beobachtet (H.W. S. 751). Diese wohl gleichzeitig als Membranstoffe (resp. deren Vorstufen) und als Reservestoffe anzusehenden Polyosen spielen in der Ernährung aller Pflanzenfresser eine große Rolle, da sie — bei Wirbellosen direkt, bei höheren Tieren mit Hilfe der Darmbakterien — z. T. verdaut werden können (vgl. **131**)). Besonders finden sich solche leicht angreifbaren Glucane in jungen, nicht verholzten Pflanzenteilen, und auf diese wirkt C. aus Schimmelpilzen (*Luizym*) auch dann ein, wenn sie noch unversehrt in der Zellwand sitzen (SILBERSCHMIDT **143**)), z. B. bei Gurken, Rettichen, Kohlrabi etc.; der Grad des Abbaus hängt von der Inkrustirung ab. Ganz analoge Zerfallserscheinungen beobachtete HERMANN **144**) an einem Rohenzym aus Kulturen einer Abart von *Bac. mesentericus*, die er als *hydrolyticus* bezeichnet; es erweicht allerlei Gemüse und Kartoffeln unter Lösung des Zellverbandes. Solche Bakterien spielen zweifellos im Darm die gleiche Rolle bei der Aufschließung dieser weniger resistenten Cellulosen, wie besonders RUBNER gezeigt hat. Es sei hier nur als neuere Angabe erwähnt, daß Lichenin bei *Cavia* zu rund 60 % ausgenutzt wird (**145**).

Eine sehr eigenartige Wirkung hat das Enzym (*Helix*, Malz) auf den Glykoläther der Cellulose (Oxyaethyl-cellulose) (hergestellt aus Baumwolle durch Aethylenoxyd bei Gegenwart von Alkali). ZIESE **146**) untersuchte diesen wasserlöslichen Stoff in der Hoffnung, in ihm ein Substrat zur exakten Erforschung der Glucanase-wirkung zu finden, da seine Molgröße annähernd der der nativen Cellulose entsprechen wird. Es ergab sich aber, daß zwar eine sehr erhebliche Verminderung der Viscosität auftritt, aber nur 25 % der möglichen Reduktion. Die Frage ist noch nicht geklärt, vgl. die analogen Befunde bei Stärke, S. 419.

Die Specifität ist absolut eingestellt auf die Glucane: wie schon KARRER (*l. c. 846*) und exakt GRASSMANN **132**) fand, verschwinden bei Dialyse alle anderen Enzyme, auch Mannanase und Inulase vollständig; nur Xylanase bleibt zurück, die sich aber durch Tierkohle herausadsorbiren läßt. Alle die anderen Enzyme sind selbständig; dies gilt auch für die Chitinase. Über die Möglichkeit, daß trotzdem Xylanase und Glucanase identisch sind, haben wir einleitend gesprochen, Näh. S. 420.

2) Darstellung und Eigenschaften.

§ 415. Darstellung. Die Darstellung der Lichenase aus *Helix* ist nicht weiter verbessert worden; dagegen haben GRASSMANN c. s. **131, 132**) ein sehr wirksames Präparat aus *Aspergillus Oryzae* (nicht aus käuflicher Taka, in der das Ferment fast verschwun-

---

142) ***H. Pringsheim, E. Thilo,*** Ferm. Abbau von Visoseseiden. Cell.-Chemie, **11,** H. 5 (1930). S.A. — 143) ***K. Silberschmidt,*** Wirk. von Cellulase . . . auf pflanzl. Objekte. Münch. Med. Ws., **1931,** 1819. — 144) ***S. Hermann, P. Neuschul,*** Bioch. des Bac. mesent. hydrol. Bioch. Zs., **281,** 219 (1935). S.A. — 145) ***A. Wallerstein,*** Verdaul. von Lichenin. Bioch. Zs., **166,** 157 (1925). — 146) ***W. Ziese,*** Einw. von Ferm. . . . auf Cellulose-glykoläther. Zs. phys. Chem., **203,** 87 (1931). S.A.

den ist) dargestellt, das als *Luizym* (Luitpold-Werk, München) in der Therapie von Darmstörungen verwendet wird. Es wird durch Dialyse weiter gereinigt.

Die Trennung von Cellobiase gelingt schon durch bloßes Altern, wobei die Cellobiase praktisch verschwindet (PRINGSHEIM *l. c. 842*, KARRER, *l. c. 847*); präparativ, nach PRINGSHEIM **147)** (Malz) und **132)**, indem Cellobiase an Al-meta-hydroxyd AlOOH adsorbirt wird (S. 272); das erhaltene Präparat ist frei von Cellobiase. Weitere Versuche zur Reinigung des Malzenzyms (ohne Beseitigung der Cellobiase) PRINGSHEIM **148)**, OTTO **149)**. Über Kaolin und Al-hydroxyd β bis zu 2,3facher Anreicherung. Nach OTTO adsorbirt $Al(OH)_3B$ vollkommen, aber bei Elution (n/2 NH_3 + Glycerol) 50 % Verlust. Anreicherung über Einengen des Malzextraktes; Acetonfällung. — Weitere Reinigung durch erneute Dialyse nach Zerlegung der KH und Proteine des Präparates **(150)**.

Einheit. Lichenase Vergleichseinheit (Li-e) Enzymmenge, die unter optimalen Bedingungen 32 mg Lichenin (wasser- und aschefrei) in 10 cm³ in 2 h bei 30° zu 25 % spaltet. Sie ist 19,2 mal kleiner als die von KARRER.

Die **Zeit-Umsatzkurve** verläuft bei Lichenin annähernd linear **(132)**. Nach PRINGSHEIM Verlauf bis zu 60 % Spaltung monomolecular, dann Hemmung, wohl durch die Spaltprodukte; bei gereinigtem Lichenin nach 60 % eine Beschleunigung. KARRER **151)** hat die Kinetik der Spaltung an umgefällter unlöslicher Cellulose untersucht; trotzdem läßt sich der Abbau rechnerisch erfassen; monomol. R. nur annähernd, eher SCHÜTZ'sche Regel (doppelte Enzymmenge Vergrößerung der Spaltung um das 1,45—1,65fache). Konz. Enzymlösungen wirken viel besser als verdünnte gleichen Gehaltes, da aus konz. Lösungen die Adsorption an die Oberflächen des festen Substrates sich schneller und vollständiger vollzieht.

Optimaler ph für alle Substrate 4,5 für *Aspergillus* gegenüber älteren Angaben für *Helix* (5,28) und Malz (ca. 5) (H.W. S. 756); fast denselben Wert fand ZIESE **146)** für *Helix*; für Malz saurer. Enzym von *Trichomonas* 5,3 (l. c. 163).

Quecksilbersalze hemmen schon 0,001 m, andere Metallionen wenig, auch Cu nicht erheblich, mehr Cu-Blausäurekomplex (ZIESE).

Cystein und Glutathion hemmen stark (ZIESE, bei Oxaethylcellulose), aber nur bei Phosphat-, nicht bei Citrat-Puffer, und nur das Ferment von *Helix*, nicht des Malzes.

3) Vorkommen.

§ **416.** In **höheren Pflanzen** finden sich Glucanasen vor Allem in den Samen der Getreide-arten; am eingehendsten bearbeitet ist von PRINGSHEIM c. s. die des Gerstenmalzes. Dagegen ist Emulsin sehr arm an Gl. **(133)**.

Die Glucanasen der **Kryptogamen** sind immer noch nicht systematisch untersucht, trotzdem hier wahrscheinlich sehr interessante Ergebnisse zu erwarten sind. Über die Enzyme von *Aspergillus* hat GRASSMANN (l. c. 131—133) eingehende Untersuchungen angestellt; sonst finde ich für Pilze nur die Angabe von LUTZ **152)**, daß der lebende Hymenomycet *Stereum purpureum* Baumwolle abbaut (in 3 Jahren!).

---

147) ***H. Pringsheim, A. Beiser,*** Trenn. der Ferm. des Gerstenmalzes II. Bioch. Zs., **172,** 411 (1926). — 148) ***H. Pringsheim, K. Baur,*** Spalt. von Lichenin . . . durch die Ferm. des Gerstenmalzes. Zs. phys. Chem., **178,** 188 (1928). — 149) ***G. Otto,*** Anreich. der Lichenase etc. Bioch. Zs., **209,** 276 (1929). — 150) ***H. Pringsheim, E. Thilo,*** Ferm. Abbau von Viscoseseiden. Cellulosech., **11,** H. 5 (1930). S.A. — 151) ***P. Karrer, H. Illing,*** Kin. des enzym. Cell.-Abbaus. Helv. Chim. Acta, **8,** 245 (1925). S.A. — 152) ***L. Lutz,*** Ferm. sol. . . hyménomycètes. C. R., **199,** 893 (1934).

Enzym aus *Bac. mesentericus hydrolyticus* HERMANN (l. c. 144); andere verwandte Bakterien wirkten schwächer.

Über die Bildung von Cellulose durch *Bact. xylinum* (B-Cellulose nach SCHMIDT, l. c. 136) s. COZIE **153)**.

Auch bei den **Wirbellosen** sind Glucanasen sicher viel weiter verbreitet, als bis jetzt nachgewiesen. KARRER **154)** fand sie auch in Würmern; ULLMANN **155)** gibt an, daß Darmsaft aller Schnecken und Raupen Lichenin angreift, aber nicht bei allen Cellulose. Nach KRÜGER (l. c. 78, S. 559) ist „Lichenase" bei „jeder untersuchten Form" zu finden; Cellulase wird seltener gefunden, d. h. die Glucanase wirkt nur schwach.

Bei der Muschel *Haliotus giganteus Gm.* fand OSHIMA **156)** Cellulase im Jecur. Eine echte Cellulase beim Bohrwurm (*Teredo*) fand POTTS **157)**, beim nordwestlichen Schiffswurm (*Bankia setacea*) im Jecur BOYNTON **158)**. Bei *Astacus* (Magensaft) fanden schwache Licheninspaltung KRÜGER u. GRAETZ (l. c. 77).

Bei holzfressenden Insekten (H.W. S. 750) gibt es nach MANSOUR **159)** auch solche, die tatsächlich durch eine eigene Cellulase die Cellulose spalten. Andere (z. B. Termiten) haben in ihrem Darm symbiontische Mikroben und Protozoen (s. u.), die dies für sie besorgen und dann verdaut werden. Ähnliche Angaben macht CAMPBELL **160)**. Eigene Enzyme fand MANSOUR bei der Käferlarve *Macrotoma palmata*, FALCK **160a)** bei *Hylotrupes*, RIPPER **161)** bei anderen Käferlarven, so bei *Cerambyx* (nicht ganz sicher), *Xestobium*; bei anderen Larven von Käfern oder Lepidopteren fehlt sie, ebenso bei holzbewohnenden Asseln (*Chelura, Limnoria*) (YONGE **162)**), die Holz garnicht verdauen. Cellulase bei der Wanderheuschrecke NENJUKOW und PARFENTJEW (cit. bei 78).

Protozoen: Bei den Darmsymbionten der Termiten, den Flagellaten *Trichomonas termopsidis* u. a., fand TRAGER **163)** eine Cellulase; *Vampyrella lateritia* (*Rhizopoda*) greift nach LLOYD **164)** die Zellwände von *Spirogyra* an.

III. Chitinasen.

1) Chitin.

§ 417. Wir haben das Chitin zu den Glucanen und somit sein spezifisches Enzym Chitinase zu den Glucanasen gestellt, weil es sich in der Tat, gemessen an seiner Wirkung, dieser Enzymgruppe unmittelbar anschließt, indem es ebenfalls Bindungen zwischen Glucosen löst, während die Aminogruppe nichts damit zu tun hat, da sie als solche an der Kettenbindung nicht beteiligt, vielmehr frei, wenn auch acetylirt, vorhanden ist.

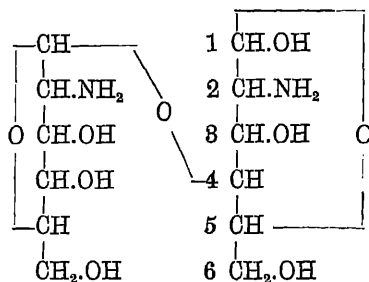
---

153) ***Cozie***, Ét. bioch. de Bact. xylinum. Rev. gén. bot., **46** (1934); BPh **84**, 314. — 154) ***P. Karrer, H. Illing***, Ferm. Spalt. der Gerüstcellul. Koll. Zs., **36**, Erg. Bd., 91 (1925). S.A. — 155) ***T. Ullmann***, Einw. der Ferm. einiger Wirbell. auf . . . KH. Zs. vergl. Phys., **17**, 520 (1932); BPh **70**, 658. — 156) ***K. Oshima***, Enz. in . . . Haliotus. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan., **7**, 17 (1931). — 157) ***F. A. Potts***, Struct. and funct. of the liver of Teredo. Proc. Cambr. Phil. Soc. Biol. Sci., **1**, 1 (1923), cit. n. 78. — 158) ***L. C. Boynton, R. C. Miller***, Cellulase in the ship-worm. Jl. of biol. Chem., **75**, 613 (1927). — 159) ***K. Mansour, J. J. Mansour-Bek***, Holzverd. durch Insekten. Proc. Roy. Acad. Amsterdam, **36**, 795 (1933). Jl. of exp. Biol., **11**, 243 (1934); BPh **83**, 48. — 160) ***W. G. Campbell***, Destruct. of oak wood by . . . Lyctus and Xestobium. Biochem. Jl., **23**, 1290 (1929). — 160a) ***R. Falck***, Scheindestruct. des Koniferenholzes durch Hylotrupes. Cell.-Chemie, **11**, 89 (1930). — 161) ***W. Ripper***, Celluloseabbau bei der Holzverdau. xylophager Insekten. Zs. vergl. Phys., **13**, 314 (1930); BPh **60**, 390. — 162) ***C. M. Yonge***, Abs. of cellulase in Limnoria. Nature, **119**, 855 (1927). — 163) ***W. Trager***, Cellulase from symbiot. intest. flagell. Biochem. Jl., **26**, 1762 (1932). — 164) ***F. E. Lloyd***, Behav. of Vampyrella etc. Michigan Acad. Sci., **7**, 395 (1926), cit. n. 78.

Chitin ist der charakteristische Gerüststoff vieler Wirbelloser, besonders der Arthropoden (Krebse, Insekten), findet sich schon bei dem uralten Genus *Limulus* (Pfeilschwanzkrebs) (FRÄNKEL **165**)); im Pflanzenreich ist es auf wenige Ordnungen (Pilze und Flechten) beschränkt. Ob tierisches und pflanzliches Chitin völlig identisch sind, wird bezweifelt (s. u.).

Struktur des Chitins. Diese Frage der Zuordnung des Enzyms hängt also wie stets mit dem Aufbau des Substrates zusammen (**166**)). Dabei sind zwei Dinge zu unterscheiden: die Natur des Kettenbausteins und seine Verknüpfungsart. Der Kettenbaustein ist **d-Glucosamin** (Chitosamin), das von LEVENE **167**) endgiltig als 2-Amino-glucose sichergestellt worden ist. Weiter ist lange bekannt, daß dieser Aminozucker als N-Acetyl-glucosamin gebunden ist.

Pflanzliches Chitin (Mycetin) soll im Gegensatz zu dem tierischen neben Glucosamin nach DOUS c. s. **268**) noch eine Methylpentose (Mycetose) enthalten. Wenn sich dies bestätigen sollte, wäre es enzymtypisch sehr interessant, ob auch dies Chitin von Chitinase zerlegt wird. Untersuchungen dieser Art an pflanzlichen Chitinen von KARRER (s. u.) ergaben auch bei Chitin aus Pilzen glatte Spaltung mit Ausbeute von 80 % Acetylglucosamin. Auch die Röntgen-diagramme sind identisch (**173**). Nach diesen Befunden und auch von vornherein ist die Ausbildung einer solchen gemischten Kette überaus unwahrscheinlich.

```
                        ┌──────────┐
 ┌CH────     1 CH.OH    │
 │ |     \     |        │
 │ CH.NH₂ \  2 CH.NH₂   │
 │ |       O   |        │
 O CH.OH   \ 3 CH.OH    O
 │ |        \  |        │
 │ CH.OH     └4 CH      │
 │ |           |        │
 └CH         5 CH ──────┘
   |           |
   CH₂.OH    6 CH₂.OH
```

Chitobiose nach **174**).

Was nun die Verknüpfung der Baugruppen anlangt, so hatte KARRER **169, 170**) eine Formel aufgestellt, in der die Aminogruppe als Bindeglied zwischen den Hexoseresten auftreten sollte. Sein Hauptargument war, daß bei der Destillation mit Zinkstaub ein substituirtes Pyrrol, Chitopyrrol, entsteht, an dem die 6 C der Glucose noch haften; es ist sehr wahrscheinlich 2-Methyl-N-hexyl-pyrrol; es sollte also eine Glucose als offene Kette erhalten bleiben, eine zweite an dem gemeinsam sie verbindenden N einen Ring bilden. Später hat KARRER **171**) diese Formel, z. T. auf grund eigener Befunde (s. u.), aufgegeben und sich der Annahme einer rein glykosidischen Struktur angeschlossen.

Diese vor KARRER's Befunden geltende Annahme, nach der also Chitin eine echte Polyose ist, wurde gegen KARRER von K. H. MEYER u. MARK **172**), z. T. auf grund der Röntgendiagramme von GONELL **173**), neu begründet. Chitin muß mindestens 20 Acetylglucosamine enthalten, in derselben Art wie in der Cellulose in 1,4-Bindung von Pyranosen und eine digonale Schraubenachse bildend. BERGMANN **174**) hat dann die Kettentheorie rein chemisch erwiesen durch Darstellung einer **Chitobiose** im acetolytischen Abbau, die ein ganz normales Di-glucosamin in 1,4-Bindung mit freien Aminogruppen in 2 ist, völlig entsprechend der Cellobiose. Dieselbe Biose erhielt ZECHMEISTER **175**) bei der Hydrolyse mit überkonz. HCl (wie bei Cellulose, vgl. l. c. 101), sowie ferner eine Chitotriose mit 3 Glucosaminen. Endlich

---

165) ***S. Fränkel, C. Jellinek,*** Limulus polyphemus. Bioch. Zs., **185**, 384 (1927). — 166) ***H. Ohle,*** Aminozucker, Chitin, Hb. der Bioch. Erg. Werk, Bd. I, S. 159 (1933). — 167) ***P. A. Levene,*** Config. of 2 Aminohexonic acids etc. Jl. of biol. Chem., **63**, 95 (1925). — 168) ***Dous, Ziegenspeck,*** Chitin der Pilze. Arch. der Pharm., **264**, 751 (1926). — 169) ***P. Karrer, A. P. Smirnoff,*** Chitin. Helv. Chim. Acta, **5**, 832 (1922). S.A. — 170) ***P. Karrer, A. Hofmann,*** Enzym. Abbau von Chitin etc. ibid., **12**, 616 (1929). — 171) ***P. Karrer, S. M. White,*** Chitin. ibid., **13**, 1105 (1930). — 172) ***K. H. Meyer, H. Mark,*** Aufbau des Chitins. Ber. Chem. Ges., **61**, 1936 (1928). — 173) ***H. W. Gonell,*** Röntgenogr. Studien am Chitin. Zs. phys. Chem., **152**, 18 (1926). — 174) ***M. Bergmann c. s.,*** Chitin und Chitobiose. Ber. Chem. Ges., **64**, 2436 (1931). S.A. — 175) ***L. Zechmeister, G. Tóth,*** Hydrolyse von Chitin mit HCl. ibid., **64**, 2028, **65**, 161 (1931/2).

wurde der definitive Beweis der cellulose-ähnlichen Kettenstruktur durch Isolirung eines amorphen, wasserlöslichen Chitodextrins erbracht (176).

KURT H. MEYER 176a) hat durch erneute genauere Röntgen-diagramme die Struktur näher bestimmen können. Die Identitätsperiode ist 10,46 Å, die Zahl der Grundmoleküle in einer Elementarzelle = 8. Raumgruppe V^4. Unklar bleibt nur noch, ob die Glykoside α oder β sind, da die sterische Specifität der Chitinase nicht bekannt ist (177).

Bei der Alkalibehandlung entsteht aus Chitin unter Abspaltung eines Teils der Acetylgruppen das Chitosan, ein Gemisch polymerer Glucosamine mit noch 12 % Acetyl, die bei der enzymatischen Hydrolyse (s. u.) anscheinend noch partiell acetylirte Tri- und Tetraglucosamine liefern; sie sind überaus stabil, werden erst durch siedende konz. HCl zu Glucosamin aufgespalten (170). Im Chitosan sind die noch vorhandenen Acetylgruppen nicht an N gebunden, da das gesamte N nach VAN SLYKE freigesetzt werden kann. Chitosan enthält also primäre Aminogruppen, wie auch aus dem Verhalten gegen Benzolsulfochlorid hervorgeht; auch in Methyl-chitosan läßt sich ein zweites H durch Benzolsulfochlorid substituiren. Da die NH_2-Gruppe frei ist, kann sie nicht der Kettenverknüpfung dienen (171). — Die Abspaltung des Acetyls aus dem Chitin ohne Sprengung der Ketten ist nach (172) eine permutoide Reaktion (vgl. l. c. 98).

2) Chitinasen.

§ 418. Das Enzym wurde von KARRER 170) im Verdauungssaft von *Helix* entdeckt und benannt. Es spaltet genuines Chitin nur langsam; wie bei Cellulose genügt aber einfaches Umlösen (Lösen in konz. HCl, Eingießen in Wasser), um es leicht angreifbar zu machen. Als Endprodukt entsteht N-Acetylglucosamin, ebenso aus tierischen wie aus Pilz-chitin (178); der Weg geht über die Chitodextrine zu den Oligosen, Chitotriose und Chitobiose und weiter zur Monose. Auch die niedermolekularen Abbaustufen des Chitins werden nur von Chitinase gespalten, nicht von β-Glucosidase (im Emulsin, s. u.) (GRASSMANN c. s. 177), HELFERICH 179)).

Tatsächlich spaltet Chitinase auch synthetische Glykoside des N-Acetylglucosamins, nämlich Phenol-N-acetyl-glucosaminid (HELFERICH 179)), während die nicht acetylirten Phenolglucosaminide gegen Chitinase wie gegen β-Glucosidase resistent sind (vgl. S. 300).

Chitosan verhält sich anders: es wird zwar ebenfalls gespalten, es tritt aber kein freies N-Acetylglucosamin auf, sondern nur die Poly-glucosamine (170); wohl aber wird wieder acetylirtes Chitosan glatt zum Endprodukt hydrolysirt. Die Acetylirung ist also für den enzymatischen Totalabbau nötig, und zwar ist sie specifisch nötig: Einführung anderer Acyle (Formyl, Benzoyl) führen zur Resistenz des Chitosans (171).

Darstellung. Eine Reindarstellung des Enzyms liegt noch nicht vor. Immerhin ist GRASSMANN c. s. 177) die Gewinnung eines Chitinase-präparates aus Mandel-Emulsin gelungen, das praktisch keine β-Glucosidase mehr enthielt; dasselbe fand HELFERICH 179) insofern, als er beim Reinigen eine Verschiebung der beiden Wirkungen feststellte, und es ebenso durch Erwärmen auf 70° von der hier noch stabilen Mannosidase des Emulsins trennen konnte (vgl. S. 255).

---

176) ***L. Zechmeister, W. Graßmann, G. Tóth, R. Bender,*** Verknüpfungsart der Glucosaminreste im Chitin. ibid., **65**, 1706 (1932). S.A. — 176a) ***K. H. Meyer, G. W. Pankow,*** Constit. etc. de la chitine. Helv. Chim. Acta, **18**, 589 (1935); BPh 88, 170. — 177) ***W. Graßmann, L. Zechmeister, R. Bender, G. Tóth,*** Chitinspalt. durch Emulsin. Ber. Chem. Ges., **67**, 1 (1934). S.A. — 178) ***P. Karrer, Götz von François,*** Enzym. Abbau des Chitins. Helv. Chim. Acta, **12**, 986 (1929). — 179) ***B. Helferich, A. Hoff,*** Ferm. Spalt. von Glykos. des Acetylglucosamin. Zs. phys. Chem., **221**, 253 (1933). S.A.

Grassmann c. s. **177)** zeigten, daß die äußeren Teile der Mandeln besonders reich an Chitinase sind, und daß man aus solchen Auszügen durch Tonerde C_γ die β-Glucosidase herausadsorbiren kann. Umgekehrt enthält nach der Helferich-Winkler'schen Silbermethode gereinigtes Emulsin nur noch wenig Chitinase (1 : 3500).

Opt. ph = 5,2, bei Chitosan 4,5 **(170)**. — Bei 70° geht das Enzym zugrunde **(179)**. Die **Kinetik** folgt annähernd der Schütz'schen Regel. Verdoppelung der Fermentmenge ergibt 1,3—1,7fach größeren Abbau.

Einheitlichkeit des Enzyms? Nach den Spaltungszahlen von Grassmann c. s. **177)** hat es den Anschein, als ob hier wie bei allen Kohlenhydraten der totale Abbau von zwei Stufen-Fermenten katalysirt wird, d. h. hier, daß die Chitinase nur noch auf Chitodextrin wirkt, dagegen die Oligosen durch eine besondere **Chitobiase** zerlegt werden; ebenfalls aus diesen Zahlen heraus scheint es nicht, als ob die Oligosen von der Cellobiase selbst zerlegt werden; es gibt also wohl wirklich eine eigene specifische Chitobiase. Genaueres ist noch nicht bekannt.

Vorkommen der Chitinase. Systematische Nachforschungen nach dem Ferment liegen nicht vor. Die drei bisher genauer bekannten Quellen sind Verdauungssaft von *Helix*, Mandelemulsin und das Fermentpräparat aus *Aspergillus oryzae* (Grassmann c. s. l. c. 133, S. 174).

Es ist aber ohne Weiteres anzunehmen, daß die Enzymgruppe weit verbreitet ist. Man wird sie bei den meisten Kryptogamen finden, die tierische oder pflanzliche Überreste zerstören, wie Schimmelpilze und Bakterien, und bei wirbellosen Tieren, die Insekten oder Pilze fressen. Daß Chitin verdaut werden kann, ist für Spinnen fressende Wespen von Ramme (1920, cit. n. 78), für Pilze fressende Käferlarven (*Platydema tricuspis Motsch.*) von Kemner **180)** und Schulze **181)** angegeben worden.

In vitro fand Abbau von Chitin Graetz **182)** im Kropfsaft der Schnecke *Limax maximus*.

Wigglesworth **183)** fand eine kräftig wirkende Chitinase in den Hautdrüsen der Wanze *Rhodnius prolixus*, die eine wesentliche Funktion bei der Häutung hat, indem sie die alte Cuticula auflöst, während gleichzeitig in den Oenocyten der Hypodermis das Material für die neue Cuticula synthetisirt wird. Der ganze Vorgang wird durch Hormone gesteuert.

---

180) ***N. A. Kemner***, Spinnende Tenebrionidenlarven. Entomol. Tidskr., **47**, 65 (1926), cit. n. 78. — 181) ***P. Schulze***, Chitinige Gespinstfäden der Larve von Platydema etc. Zs. Morphol. und Ökol., **9**, 333 (1927), cit. n. 78. — 182) ***E. Graetz***, Verdau.-Ferm. . . . einheim. Pulmonaten. Zs. phys. Chem., **180**, 305 (1929). — 183) ***V. B. Wigglesworth***, Physiol. of the cuticle etc. in Rhodnius prolixus. Quart. Jl. Micr. Sci., **76**, 269 (1933), cit. n. Naturw., **1935**, 136.

C. Cytasen (Hemicellulasen).

1) Allgemeines; Substrate.

§ 419 (*H.W.* § *416*). Wir haben § 413 den Vorschlag gemacht und begründet, daß wir künftig den alten Namen „Hemicellulasen" nur noch in der Art beibehalten wollen, daß er als nun einmal unausrottbar ein Synonym für den Namen „Cytasen" bilden soll. Diesen ebenfalls alten Namen wollen wir für die Gruppe der Polyasen beibehalten, die Polyosen mit anderem Bautypus spalten, als die gesondert behandelten Glucane (α = Stärke, β = Cellulose u. Ä.) und Fructane. Das will sagen, die Polyosen, deren Baugruppen andere Zucker sind, und die man dann weiter als Mannane, Galactane, Arabane und Xylane (resp. gemischte Ketten, s. u.) unterscheiden kann. Bisher hat man meist auch diese Polyosen deskriptiv chemisch zu den „**Hemicellulosen**" gerechnet. Enzymtypisch ist dies nicht mehr möglich. Man hat bisher in den verwickelten Gemischen der Zellwandstoffe oder Reservestoffe der Pflanzen auf grund ziemlich willkürlicher Trennungsverfahren außer den hier garnicht zu berücksichtigenden incrustirenden (holzbildenden), also irgendwie zur Gruppe der Lignine gehörenden Stoffe noch die „echte" Cellulose unterschieden von dem Rest, der dann übrig blieb; und dieses ganze Gemisch als Hemicellulosen bezeichnet. So z. B. Alles das, was in Alkalien löslich ist, wobei man aber je nach der Methode (kalt oder heiß, wässeriges oder alkoh. Alkali) ganz verschiedene Dinge herausbekommt (s. z. B. NORMAN **183a**). Dieses Gemisch umfaßt nun aber außer leichter löslichen Glucanen (Reservecellulosen vom Typus Lichenin) noch die Polyosen aus anderen Zuckern, sowie ferner noch Polyuronide (Pectine u. Ä.), auf die wir gesondert zurückkommen.

CANDLIN **184**) will sogar nur das als Hemicellulosen bezeichnen, was durch Abspaltung von CO_2 aus Uronsäuren, d. h. indirekt den Pectinen, entsteht, dann bleiben aber eigentlich nur die Pentosane übrig.; vgl. dazu aber wieder NORRIS (l. c. 125a), der grade auf grund der CANDLIN'schen Einteilung vorgegangen ist und nun wieder ein Glucan unter den Hemicellulosen findet.

Im H.W. konnten wir aus dieser Wirrnis nicht herauskommen, weil es tatsächlich den Anschein hatte, als gäbe es für Glucane zwei Enzymgruppen, eine für die „echte" Cellulose (Cellulase) und eine für den Glucan-Anteil der „Hemicellulosen" (Lichenase). Das hat sich heute dahin geklärt (§ 413), daß es nur eine Gruppe Glucanasen gibt, die alle überhaupt angreifbaren Glucane (d. h. die mit normalen Cellobiose-Ketten) spaltet. Diese vereinfachende Feststellung erzwingt also die Herausnahme aller Glucane aus dem Begriff der „Hemicellulosen", zum mindesten vom enzymtypischen Gesichtspunkt aus. Und da wir auch die ganz anders gebauten Polyuronide herausnehmen müssen, so bleibt für den alten Begriff Hemicellulosen nichts Anderes mehr übrig, als die Polyosen mit anderen Zuckern als Baugruppen.

183a) ***A. G. Norman,*** Hemicelluloses. Bioch. Jl. **29**, 945 (1935); BPh **89**, 31. — 184) ***E. J. Candlin, S. B. Schryver,*** Cell wall subst. of plants. Proc. Roy. Soc., **B 108**, 365 (1928).

Diese neue Gruppe der „Hemicellulosen" sondert sich also enzymtypisch völlig ab, und dem entspricht, daß man auch den Nachweis führen kann, daß, ebenso wie die Oligasen zuckerspecifisch sind, auch die Polyasen substratspecifisch sind. Mannanase ist z. B. nach GRASSMANN c. s. (l. c. 132) ebenso specifisch auf die Baugruppe der Mannose eingestellt wie die Mannosidase (S. 254). Wir haben also eine besondere Gruppe von Fermenten vor uns, die von den Glucanasen gruppenverschieden ist, und unter sich mit großer Wahrscheinlichkeit vier gesonderte Untergruppen je nach den Substraten enthält. Um nun den dauernden Verwirrungen mit dem alten Begriff Hemicellulasen vorzubeugen, der wie gesagt eine (nicht existirende) Sondergruppe von Glucanasen mit umfaßte, schlage ich vor, diesen Namen ganz in den Hintergrund zu stellen und diese Gruppe (also die alten „Hemicellulasen" ohne Glucanasen) nunmehr mit dem ebenfalls historischen Namen **Cytasen** neu zu benennen. Zur Gruppe der Cytasen gehören dann Mannanasen, Galactanasen, Xylanasen und Arabanasen. Wir werden § 420 sehen, daß vielleicht die beiden letzteren Gruppen als selbständige Fermente nicht existiren.

Trotzdem diese Fermente eine erhebliche Bedeutung besitzen, und zwar ebensowohl vom Standpunkt der hier besonders interessanten Specifitätsfragen, wie auch biologisch für den Pflanzenstoffwechsel, z. B. bei der Samenkeimung, ist ihre Erforschung sehr im Rückstande. Die Fermente selbst sind wie alle Polyasen außer den Amylasen schwer zugänglich, wahrscheinlich im natürlichen Zustand stark gehemmt, in Extrakten sehr schwach wirksam, und dazu stets in bunten Gemischen mit allen möglichen anderen Fermenten. Wir haben also den an sich schon sehr spärlichen Angaben im H.W. nur sehr wenig hinzuzufügen.

Die **Substrate** sind ebenfalls erst seit kurzer Zeit mit moderner Methodik in Angriff genommen. Generell kann man von allen sagen, daß sie wieder polymer-homologe Reihen langgliedriger Kettenmoleküle bilden, wobei im grunde keine anderen Probleme auftauchen wie bei der Cellulose. In den meisten Fällen sind die Ketten in bezug auf die Baugruppen strukturell homogen; in einigen Fällen wird eine inhomogene Kette (Glucose + Mannose, Galactose + Arabinose) behauptet. Das letztere ist an sich wahrscheinlicher als das erstere, denn Arabinose entsteht aus der Galacturonsäure der Pectine, wie Xylose aus Glucuronsäure. Xyloglucane sind noch nicht beschrieben, wohl aber kommen Xylosido-glucosen vor, so die Primverose. Vielleicht ist das sehr resistente Glucan aus Kohlarten (l. c. 129) ein Xyloglucan. Was für Enzyme diese gemischten Ketten spalten, ist vorläufig völlig undurchsichtig. Es seien also kurz die wichtigsten Angaben zusammengestellt, soweit wir diese Kenntnisse für die Enzymspaltung benötigen.

Am einfachsten scheint es beim **Xylan** zu liegen, dem Zucker des Holzgummis, das z. B. durch Extraktion von Laubholz mit Alkali erhalten werden kann. Reinigung führt dann zum Xylan, das dadurch auch frei von Araban erhalten werden kann. Hydrolyse liefert d-Xylose, nach HAWORTH **185)** 93 %; ausserdem 6 % l-Arabinose in furoider Form **(186a)**. Methylirung und Spaltung liefert 2,3-Dimethyl-xylosid, und zwar der Xylopyranose. HAWORTH **186)** konnte durch vorsichtige Acetylirung und Spaltung eine Xylobiose sicherstellen, deren Oxydationsprodukt Xylobionsäure durch Methylirung aufgeklärt werden konnte. Danach ist die Xylobiose pyroid und in 1,4 gebunden, und zwar β. Xylan ist also genau wie Cellulose gebaut. Die Kettenlänge

185) ***H. A. Hampton, W. N. Haworth, E. L. Hirst,*** Constit. of Xylan. Jl. of Chem. Soc., **1929**, 1739. — 186) ***W. N. Haworth, E. G. V. Percival,*** Pyranose struct. of xylan. ibid., **1931**, 2850. — 186a) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, E. Oliver,*** Const. of Xylan. ibid. **1934**, 1917.

wird von SCHMIDT 187) aus der Bestimmung der endständigen Carboxyle auf genau 32 Glucosen angegeben (vgl. S. 339).

Dagegen folgert HAWORTH **186a)** aus seinem neuen Befunde einer Arabofuranose, daß Xylan eine Kette von 18—20 Xylopyranosen ist; das andere Endglied ist noch unsicher, keine Carboxylgruppe (gegenüber SCHMIDT). Diese kürzeren Ketten sind anscheinend eben durch die Arabofuranose zu einem größeren Molekül vereinigt, das auf 75 — 80 × C_5 geschätzt wird.

Die Hydrolyse mit Enzym von *Helix* lieferte EHRENSTEIN **188)** 69 % Xylose; mit Malzenzym erhielt LÜERS **189)** 75 %.

Über das **Araban** ist in reinem Zustande noch nichts bekannt, ebensowenig über ein spezifisches Ferment. Was SALKOWSKI „Araban" genannt hatte (aus *Gummi arabicum*), enthält nur ca. 30 %, daneben Hexose, Rhamnose etc. Über angeblich gemischte Galactoarabane s. u.

Die einzige Angabe über ein durch Enzyme spaltbares „Araban" gehört wahrscheinlich nicht hierher; sie sei aber hier untergebracht, da die enzymtypische Sachlage unklar ist. F. EHRLICH **191, 192)** hat aus Pectinen ein „Araban" isolirt (§ 422), das im Wesentlichen aus einer Tetraanhydro-tetraarabinose und deren Abbauprodukten besteht. Dieses **Arabosan** nennt EHRLICH Araban. Er fand nun, daß es durch Taka langsam, aber total zu Arabinose gespalten wird, und diskutirt die Frage, ob hier eine Amylase (?) oder eine besondere „Arabanase" wirksam ist. Ersteres ist sicher nicht, letzteres wahrscheinlich nicht der Fall. „Arabanase" würde nach Analogien nur auf wirkliche, d. h. langkettige Arabane wirken, und nicht auf Anhydride. Die Sache ist vollkommen unklar; entweder wirkt hier ein ganz besonderes Enzym oder Galactosidase, wie auf die Heteroside der Arabinose; ob α oder β, kann man nicht sagen, da die Konfiguration des Arabosans nicht bekannt ist; wahrscheinlich ist sie α, und dann wird es wohl die „Lactase" des *Aspergillus Oryzae* sein, da α-l-Arabinoside enzymtypisch den β-d-Galactosiden entsprechen (§ 332), und α-Galactosidase in der Taka nicht sicher nachgewiesen ist. Dasselbe gilt ohne Weiteres für die Spaltung des „Arabans" durch „Pectinase" aus anderen Quellen. Denn überall, wo diese vorhanden ist, werden sich auch Galactosidasen finden, so z. B. in den von EHRLICH benutzten sonstigen Schimmelpilzen.

An sich ist das Auftreten dieses Tetra-arabosans als Komponente des Pectins (§ 422) sehr interessant, denn man kann wohl mit EHRLICH annehmen, daß es ganz direkt aus der Tetra-galacturonsäure durch Abspaltung von CO_2 entsteht (s. o.). EHRLICH hält es für einen Teil des Moleküls; es ist aber wahrscheinlicher, daß es sich um eine — durch Kochen mit Wasser zerlegbare — Symplexbindung handelt.

Mannane. Hier liegen die Dinge wesentlich komplicirter, weil es mehrere Mannane gibt, deren Strukturfragen nicht klar sind. Wie bei den Glucanen lassen sich grundsätzlich unterscheiden: unlösliche, der echten Cellulose ähnliche Mannane, wie das der Samen der Steinnuß-palme *Phytelephas macrocarpa*, das vegetabilische Elfenbein oder *Corrozo* (H.W. S. 756); andererseits quellbare, Schleime liefernde Reservestoffe, am bekanntesten der „Salepschleim" aus den Knollen von Orchideen (*Tubera Salep*).

Wahrscheinlich sind diese beiden Typen wieder durch die Molatgröße unterschieden; denn beide enthalten nur Mannose. Daneben sind früher eine Reihe anderer solcher Reservestoffe beschrieben worden, so Seminin, Carubin etc. und dazugehörige Enzyme; auch „Mannogalactane", die als chemische Stoffe wohl sicher nicht existiren.

Über die feinere Struktur haben sich zeitweilig dieselben grundsätzlichen Erörterungen

187) ***E. Schmidt* c. s.**, Kettenlänge der Cellulosen. Cell. Chemie, **18**, 129 (1932). — 188) ***M. Ehrenstein***, Enzym. Abbau des Xylans. Helv. Chim. Acta, **9**, 332 (1926). S.A. — 189) ***H. Lüers, W. Volkamer***, Hemizell. spalt. Enz. des Malzes. Ws. Brau, **45**, 83 (1928). S.A. — 190) ***C. L. Butler, L. H. Cretcher***, Salkowski araban. Jl Amer. Chem. Soc., **52**, 4509 (1930). 191) ***F. Ehrlich, F. Schubert***, Tetra-Araban. Bioch. Zs., **203**, 344 (1928). S.A. — 192) ***F. Ehrlich, A. Kosmahly***, Pectin der Obstfrüchte. ibid., **212**, 162 (1929). S.A.

abgespielt wie überall; PRINGSHEIM glaubte auch hier an „Associate" und Zerfall in bimere „Grundkörper" (l. c. 12, S. 298); heute hat auch hier die Kettenlehre gesiegt. Die Mannane bestehen sämtlich aus langen Ketten von Manno-pyranosen in 1,4-Bindung, die sterische Form der Bindung steht noch nicht fest; nach den Ausführungen auf S. 254 sollte sie α sein. Das Mannan von *Phytelephas* ist zuerst genauer von PRINGSHEIM (*l. c. 851*) untersucht worden, der nachwies, daß es nur aus Mannose aufgebaut ist; bei der Acetolyse entsteht Mannobiose; ferner hat BERTRAND **193)** aus dem Acetolysegemisch Tetra- und Pentamannosen isolirt; das Trisaccharid hatte beim Enzym-Abbau schon PRINGSHEIM (*l. c. 858*) gefunden; ebenso entsteht Mannobiose aus Salepmannan durch Gerstenmalz **(194, 195)**. Nach LÜDTKE **196)** besteht das Steinnuß-Mannan aus einem in verdünntem Alkali (5—10 %) löslichen Anteil A (45 % des Mehls) und einem nur in stärkerem Alkali löslichen B (25 %). Nach KLAGES **197)** ist B höher molekular oder höher aggregirt. Die Kettenlänge schätzt er auf 70—80 Mannosen, und zwar nach der Reduktion (freie Endglieder) wie nach der Ausbeute an Tetra-methyl-mannose. Beide scheinen aus Ketten von jeweilig α- und β-Mannopyranosen zu bestehen. Bei der Trennung von A und B drehen alle Derivate von A etwas höher (3—6°) als die von B, so daß hier eine Verschiebung zu gunsten von α-Ketten einzutreten scheint.

Das Salepmannan besteht ebenfalls ausschließlich aus Mannose, wie lange bekannt. PRINGSHEIM **198)** konnte die schleimige, sehr leicht verhornende Masse durch vorsichtige Entwässerung mit Alkohol in eine Pulverform bringen, die sich acetyliren läßt. Das Acetylmannan „dispergirt" kryoskopisch gemessen zur Monose-Stufe. Das führte wieder in dieselben Irrgänge wie überall zurück, so daß PRINGSHEIM sogar die von ihm selbst nachgewiesene Mannobiose für ein Reversionsprodukt hielt. Wahrscheinlich hat das Salepmannan dieselbe Struktur bei geringerer Kettenlänge; genauere Untersuchungen liegen nicht vor.

Das Konjakmannan. Eine abweichende Struktur schreibt man dem Mannan zu, das sich im japanischen Nahrungsmittel *Konyaku*, den Knollen der Aracee *Amorphophallus Konjak K. Koch* vorfindet. Es enthält noch andere Zucker, und zwar zeigte nach einiger Diskussion OHTSUJKI **199)**, daß es bei der Spaltung Mannose : Glucose 2 : 1 liefert. Die Spekulationen darüber, daß diese Polyose aus einem gemeinsamen Associat von Mannose + Glucose bestehe, einem „Mosaik-micell" (wieder erschlossen aus der Dispergirung der Acetate zur Monose-stufe) haben heute kein Interesse mehr, wohl aber die Frage, ob hier ein schwer trennbares Gemisch von einem Teil Glucan mit 2 Teilen Mannan vorliegt; oder ob man tatsächlich hier eine gemischte Kette nachweisen kann, — wenn man davon absehen will, daß vielleicht Beides nicht der Fall ist, sondern daß beide Pyranosen erst beim hydrolytischen Abbau aus einer gemeinsamen labilen Vorstufe (Enolform?) entstehen.

OHTSUJKI gibt an, daß eine käufliche Malzdiastase *Kashiwagi* die Polyose total aufspaltet, während Taka ein Trisaccharid bildet, das immer noch aus 2 Mannose + 1 Glucose besteht und links dreht (— 15,4°) (Laevidulinose). Daneben sollen höhere Abbaustufen (Mannine) entstehen, ebenso durch Acetolyse. Die Triose-Stufe wurde durch Acetolyse bestätigt **(200, 201)**; es entstand eine krist. Hendeka-acetyl-manno-gluco-triose, die sich desacetyliren läßt. Das Trisaccharid liefert mit verd. Schwefelsäure 2 Mannose:1 Glucose. Die Bindung soll 1,6 sein, die Verknüpfung mit der nächsten Dreiergruppe an 3 oder 5 ansetzen. Bei weiterer Acetolyse

193) ***G. Bertrand, J. Labarre,*** Acétol. de la mannocellulose. C. R., **185**, 1419 (1927). — 194) ***H. Pringsheim, A. Genin,*** Ferm. Spaltg. des Salepmannans. Zs. phys. Chem., **140**, 299 (1924). — 195) ***H. Pringsheim, A. Genin, A. Perewosky,*** Trenn. der F. des Gerstenmalzes. Bioch. Zs., **164**, 117 (1925). — 196) ***M. Lüdtke,*** KH des Steinnußsamens. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **456**, 201 (1927). — 197) ***F. Klages,*** Konst. von Mannan. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **509**, 159, **512**, 185 (1933/4). — 198) ***H. Pringsheim, G. Liss,*** Salepmannan. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **460**, 32 (1928). S.A. — 199) ***T. Ohtsujki,*** Konjakmannan. Acta Phytochim., **4**, 1 (1928); BPh **44**, 34. — 200) ***K. Nishida, H. Hashima,*** Glykomannan aus Konjak. Jl. Dep. Agric. Fukuoka, **2**, 277 (1930); BPh **59**, 198. — 201) ***J. Sakurada, K. Hutino,*** Glucomannan aus Konjak. Bull Agr. Chem. Soc. Japan, **6**, 78, 82, **7**, 1, 3, 65 (1930/1).

entstehen Glucomannobiose und Mannobiose. Die vermutlichen Formeln s. l. c. 12, S. 302. SAKURADA 202) fand ein amorphes A und ein kristallisirtes wasserunlösliches B. Trotzdem auch die Röntgen-diagramme (202) für eine Elementarzelle aus drei Hexosen spricht, scheint mir doch der ganze Sachverhalt einer Nachprüfung zu bedürfen, besonders da inzwischen ein zweiter Fall, ein Galacto-Araban angegeben wird.

Auch das **Hefegummi** (H.W. S. 558) besteht zum Hauptteil aus einem Mannan. Wie S. 422 berichtet, wird die Zellwand der Hefe durch reine β-Amylase (Malz), nicht durch α angegriffen; auch Cellulase wirkt nicht; das ebenfalls darin enthaltene Glucan (ZECHMEISTER, l. c. 130) ist abnorm gebaut (1,3-Ketten). Andererseits geht bei der enzymatischen Freilegung der Saccharase Hefegummi sehr reichlich in Lösung (KRAUT c. s. 203)), wobei ein besonderes sehr stabiles Enzym mitwirkt, wie schon WILLSTÄTTER (*l. c. 859*) gefunden hatte. Dies ist vielleicht eine autochthone Mannanase der Hefe; näheres ist noch nicht bekannt.

Galactane sind bisher rein nicht isolirt, Struktur und enzymtypisches Verhalten im Einzelnen also unbekannt. Abbau von Polyose-gemischen (Mannogalactanen) unter Freisetzung von Galactose ist beschrieben (H.W. S. 757/8). Entsprechend dem Gluco-mannan soll nach MIYAMA 204) in den Samen von *Arachis hypogaea* (Erdnuß) ein Galacto-araban vorhanden sein mit einem dreigliedrigen Kettenglied von Pyranosen: Galactose-Arabinose-Arabinose mit 1,4-Bindung (Überführung in kristallisirte Acetyl-produkte, Methylirung, Spaltung in Galacto-arabinose). Über enzymatische Spaltung nichts angegeben. Die Existenz eines anscheinend einheitlichen Galacto-araban in Lupinen hatte schon HEIDUSCHKA 205) angegeben. Ein physiologischer Zusammenhang liegt hier insofern vor, als man wohl sicher die Arabinose als Decarboxylirungsprodukt der Galacturonsäure der Pectine betrachten kann (s. o.).

2) Vorkommen und Eigenschaften der Enzyme.

§ 420. Über die 4 in Frage stehenden Enzyme ist noch sehr wenig bekannt. Wahrscheinlich finden sie sich sämtlich stets zusammen, da der biologische Zweck, Aufschließung der Hemicellulosen, ein ganz einheitlicher ist, ob es sich um endogenen Aufschluß wie bei der Samenkeimung oder um Verdauung von Nahrungsmitteln bei Wirbellosen oder endlich Zerstörung durch Mikroben handelt. Es ist wohl mehr dem Zufall des grade geprüften Substrats zuzuschreiben, ob man irgendwo eine „Xylanase" oder eine „Mannanase" gefunden hat. Natürlich gibt es Ausnahmen, wenn es sich um endogenen Aufschluß handelt. Wenn z. B. die Hefe von den 4 Polyosen nur Mannan enthält, so wird sie auch nur Mannanase ausbilden. Dagegen werden die Verdauungssäfte der Wirbellosen und die Mikroben wenn überhaupt wohl fast regelmäßig alle 4 Enzyme enthalten. Systematische Untersuchungen liegen nicht vor; Arabanasen und Galactanasen sind wie erwähnt bisher überhaupt nicht an reinen Substraten nachgewiesen. Es ist sogar durchaus möglich, wenn auch einige Befunde bisher für eine volle Selbständigkeit sprechen, daß es überhaupt nur zwei besondere Enzyme gibt, nämlich Galactanase und Mannanase. Es ist nicht von der Hand zu weisen, daß die von HELFERICH sicher nachgewiesene Identität der Oligasen für Xyloside und Glucoside, Arabinoside und Galactoside (§ 299), auch hier gegeben ist. Dann würde es ebensowenig „Pentosanasen" geben, wie es „Pentosidasen" gibt *); es würden dieselben Enzyme auch die genetisch und strukturell zusammengehörigen

---

*) Anm. Eine Ausnahme bilden wohl die Nucleosidasen.

202) ***Dies.***, Faserröntg.-Diagr. von Glucomannan. Zs. physikal. Chem., **B 21**, 18 (1933). — 203) ***H. Kraut, F. Eichhorn, H. Rubenbauer***, Darst. des Hefengummi durch Abbau etc. Ber. Chem. Ges., **60**, 1644 (1927). — 204) ***R. Miyama***, Galacto-araban prepared from ... peanut. Jl. Dep. Agric. Fukuoka, **4**, 195 (1935); BPh **87**, 250. — 205) ***A. Heiduschka, H. Tettenborn***, Galaktoaraban der Lupinensamen. Bioch. Zs., **189**, 203 (1927).

Polyosen spalten wie es bei den Oligosen und Glykosiden der Fall ist; denn wie bemerkt, gehört die Arabinose zur Galaktose, die Xylose zur Glucose, und sie entstehen sehr wahrscheinlich durch Abbau aus den betr. Hexosen, nämlich über die Uronsäuren. Eine Aufklärung dieser Frage wäre für die Spezifitätslehre der Fermente ebenso interessant wie für die Rolle dieser Polyosen in der Pflanze. Denn dann wäre z. B. die Existenz eines wahren Galacto-arabans mit gemischten Ketten eher begreiflich, da es dann eben von der „Galactanase" in einheitlicher Wirkung abgebaut werden kann. Umgekehrt: wenn diese gemischten Ketten sich erweisen lassen, so spricht diese Substratstruktur sehr wesentlich für die Identität der betr. Enzyme.

Über die **Cytasen der Phanerogamen,** speciell der Samen, ist im H.W. S. 750 u. ff. eine ganze Menge Material gegeben worden, mit dem für die heutigen Anforderungen wenig anzufangen ist. Exakte Nachweise liegen sehr wenig vor.

In Malz fand PRINGSHEIM eine Mannanase, die er von der Mannobiase durch Altern der Präparate trennen konnte (l. c. 194), wobei die Oligase zu grunde geht. Ebenso gelingt die Trennung durch Adsorption der Oligase an Kaolin (l. c. 195) in mehr als 20%iger alkohol. Lösung bei ph = 8. Im Mandelemulsin ist bisher nur α-Mannosidase nachgewiesen, die man wohl mit der Mannobiase identificiren darf; es ist wohl aber sicher auch Mannanase darin enthalten. Aeltere Angaben über Vorkommen einer Mannanase in den Samenschalen von *Phytelephas* sind nach MELNICK **205a)** irrig; die „Autolyse" wird dadurch vorgetäuscht, daß dem Mannan bereits lösliche Mannose-Derivate bisher unbekannter Natur beigemischt sind.

Mikroben führen sehr vielfach Cytasen, wie bereits im H.W. berichtet. Über die wahrscheinlich vorhandene Mannanase der echten Hefen s. o. **(203).**

Daß *Aspergillus Oryzae* das Konjakmannan spaltet, ist oben berichtet (l. c. 199). In ihrem hochwirksamen Präparat konnten GRASSMANN c. s. (l. c. 132, 133) Mannanase und Xylanase von den anderen Enzymen (auch Cellulase) und unter einander differenziren (s. u.). — Arabanase scheint zu fehlen, kein Angriff von *Gummi arabicum.*

Auch Hymenomyceten (*Stereum purpureum, Coriolus adustus* u. a.) bauen diese Polyosen ab, so bilden sie aus Traganth Arabinose und Galactose; das Mannan von *Ceratonia siliqua* (Caruben) wird ebenfalls abgebaut (LUTZ **206**)).

Bei **Wirbellosen** sind diese Enzyme sehr weit verbreitet. Zu den Angaben im H.W. ist zu ergänzen, daß ULLMANN (l. c. 155) Mannanase bei allen untersuchten Schnecken und Raupen gefunden hat, ebenso bei *Astacus.* Xylanase fand HINMANN **207)** im Darm von Mückenlarven (*Aedes, Culex*).

Darstellung von Xylanase aus Malz LÜERS (l. c. 189), Reinigung bis zur 21fachen Wirkung durch Adsorption an Tonerde bei ph = 5, Elution mit Phosphat bei 8,3.

Trennung der Enzyme von *Aspergillus Oryzae* (l. c. 133): bei mehrtägiger Dialyse verschwindet (mit der Inulase) die Mannanase, während die Xylanase mit der Cellulase zusammenbleibt. Nach Adsorption an Tierkohle geht nur noch Cellulase ins Eluat, Xylanase ist verschwunden. Dieser Befund spricht also gegen die Identität von Xylanase und Glucanase.

Optimale Bedingungen. Temp. 45° LÜERS (l. c. 189). **ph:** für Xylanase aus *Helix* fand EHRENSTEIN (l. c. 188) bei Citratpuffer 4,65, bei Phosphat 5,28, den letzteren auch für Malz, ebenso LÜERS (l. c. 189) 5,0. Bei *Asp. Oryzae* 4,5 (l. c. 133). Einige Angaben zur **Kinetik** s. EHRENSTEIN (l. c. 188). Xylose hemmt stark (LÜERS).

205a) ***D. Melnick, G. R. Cowgill,*** Angebl. Selbsthydrol. von pflanzl. Elfenbein. Biochem. Jl. **29**, 1515 (1935); Chem. Cbl. **1936**, I, 362. — 206) ***L. Lutz,*** Ferm. sol. . . . hyménomycètes. Hemicelluloses. C. R., **190,** 892 (1930). — 207) ***E. H. Hinman,*** Enz. in the canal of mosquito larvae. Proc. Soc. Exp. Biol., **29,** 915 (1932).

D. Polyuronidasen.

§ 421. Polyuronide (CANDLIN und SCHRYVER, (l. c. 184)) sind hochmolekulare Kohlenhydrate, die anstelle der normalen Zucker, d. h. Aldosen oder Ketosen, **Uronsäuren** gebunden enthalten, d. h. solche Gebilde, bei denen die Aldehydgruppe in C_1 erhalten geblieben, dagegen die primäre Alkoholgruppe in C_6 in ein Carboxyl umgewandelt ist. Diese Uronsäuren sind besonders wichtig, weil man sie als Vorstufen der Pentosen anzusehen hat, die aus ihnen durch Abspaltung von CO_2 entstehen: Xylose aus Glucuronsäure, Arabinose aus Galacturonsäure.

Nach F. EHRLICH **208—210)**, sowie NORMAN **211, 212)** kann man sich dies so vorstellen, daß aus den hochmolekularen Polyuroniden selbst durch Decarboxylirung die höher komplexen Pentosane (§ 419) entstehen. NORMAN nimmt weiterhin an, daß die Polyuronide ihrerseits aus echten Polyosen durch Oxydation der freien C_6-Gruppen entstehen, was die überraschende Tatsache erklären könnte, daß hier die Oxydation an der Hexose nicht am empfindlichen Carbonyl in C_1, sondern an der Alkoholgruppe in C_6 erfolgt ist. Das würde also bedeuten, daß die Entstehung der Uronsäuren über die Polyuronide erfolgt, und das entspricht ihrem Vorkommen; sie finden sich zwar auch gelegentlich monomer glykosidisch gebunden (§ 362), aber doch ganz überwiegend eben als Polyuronide; freilich nach den bisherigen genauer bekannten Befunden nicht in solchen Gebilden, die den echten Polyosen vergleichbar wären, also in polymerhomologen Ketten-Strukturen, sondern als kleinere, den „Hexosanen" ähnliche Körper, jedoch ist dies noch nicht überall geklärt und auch bei den bestbekannten Pectinen nicht unbestritten (l. c. 218). Von einer genaueren Strukturbeschreibung der Polyuronide müssen wir also bisher meist absehen. Sie finden sich als Bestandteile der Zellwände, in den Hemicellulosen im weitesten Sinne des Wortes (vgl. l. c. 184) und sekundär in den Schleimen, z. B. im Traganth; und zwar am häufigsten die Galacturonsäure in den Pectinen und im Traganth; aber auch Glucuronsäure kommt häufig vor, so nach EHRLICH in Saponinen, in Gummiarten (Lit. **209)**). Auch die KH der Algen enthalten vielleicht Glucuronsäure, vor Allem aber Mannuronsäure in der Alginsäure (§ 423). Enzymtypisch haben vor Allem die Pectine Interesse.

I. Pectinasen.

1) Allgemeines; Struktur der Pectine.

Die in Pflanzen weit verbreiteten, ebenfalls einen Anteil der „Hemicellulosen" im weitesten Sinne darstellenden Pectinstoffe sind physiologisch wahrscheinlich insofern von sehr großer Bedeutung, als sie den Grundstoff für die Entstehung der Lignine

---

208) ***F. Ehrlich,*** Pectinstoffe. Zs. ang. Chem., **1927**, H. 45. S.A. — 209) ***F. Ehrlich,*** Chemie des Pectins. Cell.-Chemie, **11**, 161 (1930). S.A.; kürzer derselbe Inhalt: Gerüstsubstanz der Pflanzenzelle. Zs. ang. Chem., **1931**, **463**. — 210) ***F. Ehrlich,*** Das Pektin-Problem. Festschr. 25. Best. Techn. Hochschule Breslau 1935. S.A.

bilden (F. EHRLICH **209, 210**) u. a.). Strukturchemisch sind sie dadurch charakterisirt, daß ihnen ein Gerüst von komplicirt verbundenen d-Galacturonsäuren zu grunde liegt, wie bereits im H.W. S. 759 berichtet werden konnte. Dieses System wird durch Hydrolyse aufgeteilt, wobei einige Specialfermente mitwirken, die man unter dem alten Namen Pectinasen (BOURQUELOT, *l. c. 869*) nunmehr zusammenfassen kann. Die feinere Struktur der Pectine ist in der Hauptsache von FELIX EHRLICH aufgeklärt worden, der mehrmals zusammenfassend darüber berichtet hat (**208—210**); vgl. a. seine Darstellung der Methodik im H.W. Bd. III, S. 918. Viele ältere Teilangaben über Structur und Gruppirung der Pectine sind dadurch überholt und werden hier nicht mehr angeführt.

Pectine finden sich in geringer Menge gelöst, so in Obstsäften, in denen ihre Ausscheidung die Gelirung herbeigeführt, meist aber in einer in kaltem Wasser unlöslichen Form, die durch Kochen oder chemische Agentien in Lösung gebracht werden kann. Diese Hauptmenge ist fest gebunden als Anteil der unlöslichen Zellwandstoffe, sei es chemisch verankert, sei es in Symplexbindung mit Polyosen. Dies ist das Propectin (Protopectin, früher nach FREMY auch Pectosin genannt); es ist als solches nicht isolirbar, zerfällt bei der Ausschälung (bereits durch kochendes Wasser) in seine Komponenten.

Struktur der Pectine. Nachdem schon früher neben allerlei undefinirbaren noch verwickelten Säuren als Bausteine Arabinose und Methanol nachgewiesen waren, gelang es EHRLICH zunächst (*l. c. 870*) **213—215**), als entscheidend wichtige Baugruppe die d-**Galacturonsäure** aufzufinden; außerdem fand er noch Essigsäure.

CHO
|
HCOH
|
HOCH
|
HOCH
|
HCOH
|
COOH

d-Galacturonsäure.

Die genuinen Pectine (der Zuckerrübe, des Flachses etc.) sind nicht isolirbar, schon beim Kochen mit Wasser zerfällt das große Molekül (oder der Symplex?) in das Hydratopectin, das seinerseits ein Gemisch ist aus einem mit 70%igem Alkohol in der Kälte herauszulösenden Gemenge von Arabosanen (fälschlich „Araban" genannt (s. u.)), und der Pectinsäure, die als Ca-Mg-Salz auftritt. Sie enthält nun noch neben Methyl, Acetyl und Galactose als Kern des Moleküls ein Gebilde aus 4 Galacturonsäuren (**211—213**), das EHRLICH als „Tetragalacturonsäure" bezeichnet hat, das aber in 2 Formen auftritt, die er später (s. u.) Pectolsäure resp. Gel-pectolsäure genannt hat.

Wo und in welcher Weise die verschiedenen Seitenketten, Methyl, Acetyl und eine Arabino-galactose an das ringförmige System der Galacturonsäure gebunden sind, ist im Einzelnen noch nicht aufgeklärt; ein provisorisches Schema s. **210**). Den ganzen Komplex der Rüben-Pectinsäure und seinen hydrolytischen Zerfall beziffert er wie folgt:

$$C_{43}H_{61}O_{38} + 9\,H_2O = \underbrace{4\,C_6H_{10}O_7}_{\text{Galacturonsäure}} + 2\,CH_3\cdot OH + 3\,CH_3\cdot COOH + \underbrace{C_5H_{10}O_5}_{\text{Arabinose}} + \underbrace{C_6H_{12}O_6}_{\text{Galactose.}}$$

Diese **Pectinsäure**, eine stark quellende, Gallerten bildende Substanz, ist das, was man früher aus wässrigen Extrakten mit Alkohol in saurer Lösung gefällt und „Pectin" genannt hat.

---

211) ***A. G. Norman***, Chem. const. of the gums. Biochem. Jl., **23**, 524 (1929). — 212) ***A. G. Norman c. s.***, Studies on pectin. ibid., **24**, 402, 649 (1930). — 213) ***F. Ehrlich, R. v. Sommerfeld***, Pektinstoffe der Zuckerrübe. Bioch. Zs., **168**, 263 (1926). — 214) ***F. Ehrlich, F. Schubert***, Inkrusten des Flachses. ibid., **169**, 13 (1926). — 215) ***Dies.***, Chemie der Pektinstoffe etc. Ber. Chem. Ges., **62**, 1974 (1929).

Dieselben Grundstoffe enthalten auch die Pectine aus den Orangenschalen (*Citrus aurantium*), der Erdbeere (*Fragaria elatior*) und Johannisbeere (*Ribes rubrum*) (**216**); hier findet sich ein sehr erheblicher Teil des Pectins als gelöstes Hydrato-pectin in den Säften (40—50 %), was deren Gelirfähigkeit bedingt.

Pectin des Flachses (*Linum usitatissimum*) ist nach **214**) verwickelter gebaut, sowohl das abspaltbare „Araban", das hier noch andere Zucker enthält, wie auch die Pectinsäure, die hier auch d-Glucuronsäure und Xylose enthält (selbständige zweite Pectinsäure?), sowie noch eine Ligninsäure.

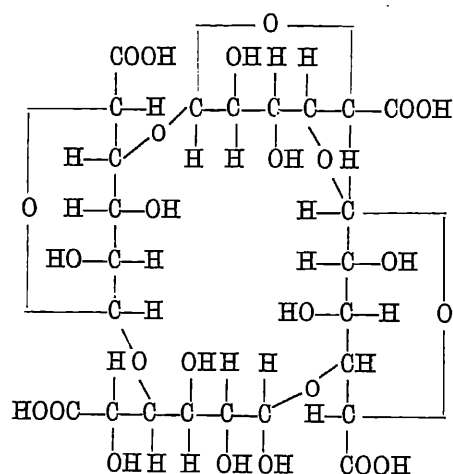
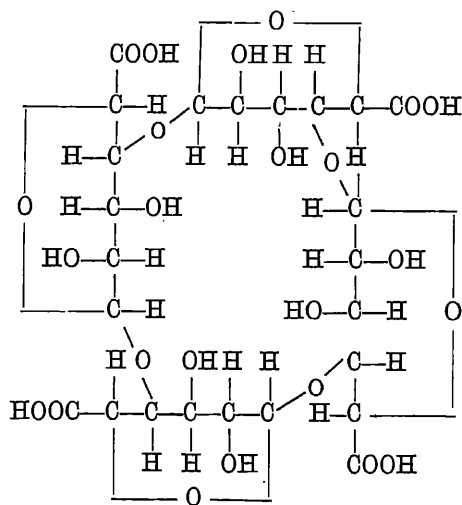
Das daneben aus Rübenpectin erhaltene sog. „Araban" erwies sich als ein Tetra-arabosan (l. c. 191), vermengt mit niederen Spaltprodukten. Es entsteht offensichtlich aus der Pectolsäure durch Abspaltung von 4 CO_2. Über seine enzymatische Spaltbarkeit durch Taka s. § 419 (l. c. 191), sowie (**216**). Davon scharf zu trennen ist die nach der obigen Formel im eigentlichen Molekül verankerte Arabinose, die bei der alkalischen Spaltung in Form eines nicht reducirenden Körpers zu gleichen Teilen mit Galactose abzuscheiden ist; bei der sauren Hydrolyse treten diese Hexosane (?) nicht auf, vielmehr werden die freien Zucker gebildet.

Dieser Komplex der Pectinsäure läßt sich nun durch Erwärmen mit verd. HCl (2—5 %) von allen Anhängseln befreien, und es entsteht der reine Grundstoff, die aus 4 Galacturonsäuren aufgebaute **Pectolsäure**, neben der noch eine zweite Form, Pectolactonsäure, auftritt (**217**).

Die letztere ist ein sekundäres Produkt, das aus der allseitig ringförmig geschlossenen Pectolsäure durch einmalige Ringspaltung entsteht, so daß sie 4 Galacturonsäuren in offener Kette enthält; dabei tritt Lactonbildung an einem Carboxyl auf, Sie ist wahrscheinlich das regelmäßig erste Produkt jeder Hydrolyse, ob durch Säuren oder das Enzym Pectolase (s. u.). Pectolactonsäure gibt keine gelirenden Salze mehr, was die bekannte Tatsache des Verlustes der Gelirfähigkeit bei zu langem Kochen in saurer Lösung erklärt (**210**).

Pectolsäure hat die Formel $C_{20}H_{30}O_{17}$ $(COOH)_4$; sie besteht aus 4 ringförmig verflochtenen Galacturonsäuren (**215**)). Ehrlich **210**) gibt ihr folgende Formel I. Sie ist aber nicht die eigentliche die Gallerten bildende Substanz, dies ist vielmehr eine anhydrische Form II, (**Gel-Pectolsäure**), die durch alkalische Hydrolyse von Pectin

I. Pectolsäure nach F. Ehrlich **210**).

```
          ——— O ———
  COOH   | OHH H   |
    |    |  | | |  |
  ———C—H /C—C—C--C—C—COOH
 |   | /O  |  |  |  \ |
 | H—C/    H  H  OH  OH
 |   |                \|
 O H—C—OH             H—C ———
 |   |                  |     |
 |HO—C—H              H—C—OH  |
 |   |                  |     |
  ———C—H             HO—C—H   O
      \                 |     |
      H O  OHH H      /C—H    |
      |  \ | | |   O/  |      |
 HOOC—C—C—C—C—C/     H—C ——————
      |  | | |  |       |
      |  H H OH |     COOH
      |——— O ———|
```

II. Gel-Pectolsäure nach F. Ehrlich **210**).

216) ***F. Ehrlich, A. Kosmahly,*** Pectin der Obstfrüchte. Bioch. Zs., **212**, 162 (1929). S.A. — 217) ***F. Ehrlich,*** Pectolase I, II. Bioch. Zs., **250**, 525, **251**, 204 (1932). S.A.

in der Kälte rein zu gewinnen ist (210); sie zeigt eine vollkommen symmetrische Struktur, die sicherlich für die Ausbildung der Gele bedeutungsvoll ist. Beim Kochen oder durch die natürlichen Enzyme der Pflanze wird sie über Pectolsäure etc. abgebaut, wobei die Gelirfähigkeit allmählich verloren geht. Diese Form findet sich am reichlichsten in den Schalen von *Citrus*, weniger in Äpfeln, garnicht in dem — nicht gelirenden — Rübenpectin, das nur Pectolsäure enthält.

Die Formulirung Ehrlich's wird von Morell, Baur u. Link 218, 218a) bezweifelt, die für die Pectolsäure eine hochpolymere Struktur in Kettenform annehmen. Sie erhielten bei der Methanolyse eines käuflichen Poly-galacturonids aus Zitronen nur 50 % des Methylesters der α,1-Methylgalacturonsäure. Der Rest bestand aus Methylglykosiden eines hochmolekularen Poly-galacturonsäureesters von 8—10 Einheiten. Ebenso verhielt sich Pectolsäure nach Ehrlich hergestellt; sie muß eine Kette von mindestens 10 Einheiten enthalten.

2) Das Enzymsystem Pectinase.

§ 422. Diesem komplicirten Aufbau des natürlichen Pectins entspricht nun wie bei allen höheren Kohlenhydraten ein ganzes System von Fermenten, die in Stufenreaktionen Schritt für Schritt das Gebilde in seine Einzelbestandteile auflösen. Die Nomenclatur der Enzyme war bisher völlig verworren; eine sichere Benennung ist auch heute erst teilweise möglich, da auch Ehrlich zwar für seine scharf definirte „Pectolase" nun einheitlich vorgeht, aber bzgl. „Pectinase" und „Pectase" noch nicht ganz klar entschieden ist. Wir wollen versuchen, einigermaßen Ordnung zu schaffen.

Das erste Enzym (**Propectinase** (Ehrlich 209)), Protopectinase (Willaman 219)) (früher Pectosinase) könnte das sein, welches das native in den Wänden unlösliche Ur-pectin, „Pectin" an sich im Sinne Ehrlich's, umwandelt, nämlich in Hydratopectin, das Gemisch der Pectinsäure mit dem „Araban". Daß dieser Vorgang, der sich beim Reifen der Beeren automatisch einstellt (s. o.), ein enzymatischer ist, ganz vergleichbar der Spaltung durch kochendes Wasser, nimmt Ehrlich mit Recht an; fraglich ist nur, ob dieses Enzym schon zu den specifischen „Pectinasen" gehört; oder ob der Vorgang nicht vielmehr ausschließlich ein Abbau eines hochmolekularen wirklichen Arabans ist, das in niedere Bruchstücke zerfällt, womit auch die anzunehmende Symplex-bindung gelöst wird. Dafür will garnichts besagen, daß Taka und andere Schimmelpilze diese Umwandlung besorgen, die ja auch wahre Pectinase enthalten; denn Taka enthält ja sicherlich auch „Arabanase", die wie § 419 bemerkt sehr wohl mit der Galactanase identisch sein könnte. Es steht also in diesem ersten oder wohl besser Vorstadium der Pectin-Hydrolyse nicht die enzymatische Wirkung an sich, sondern ihre Specifität in Frage.

Die zweite Etappe, die Hydrolyse der Pectinsäure zu Pectolsäure, ist zweifellos wieder das Werk einer Gruppe von Fermenten, die man also als Gruppe der **Pectinasen** zu bezeichnen hat. Wieviele Einzelfermente sie enthält, steht noch nicht fest; aber wahrscheinlich wird jede der eigentümlichen hydrolytischen Verkleinerungen des Moleküls: die Abspaltung von Methanol, von Essigsäure, von Arabinose + Galactose, von einem besonderen Einzelenzym katalysirt. Nennt man diese Gruppe zusammen „Pectinasen", so wird man später, wenn sie sämtlich genauer charakterisirt sind, ihnen besondere Namen geben, wie dies bei den Proteasen vor sich gegangen ist. Daß man nur diese erste Gruppe für die Hydrolyse bis zur Pectol-

---

218) ***L. Morell, L. Baur, K. P. Link,*** Polygalactur. acid. methylglyc. derived from pectin. Jl. of Biol. Chem., **105**, 1, 15 (1934). — 218a) ***L. Baur, K. P. Link,*** Polygalact. acid methylglyc. der. from . . . „pectolsäure" etc. Jl. of Biol. Chem., **109**, 293 (1935); BPh 89, 487. — 219) ***F. R. Davison, J. J. Willaman,*** Pectic enz. Bot. Gazette, **88**, 329 (1927).

säure als Pectinasen bezeichnet, und für die letzte Etappe, die Hydrolyse der Pectolsäure selbst, ein neues Enzym benennt (s. u.), entspricht durchaus den Nomenclaturprincipien bei den Carbohydrasen; denn überall bezeichnen wir mit dem Namen des hochmolekularen Substrats nur diejenige Gruppe, welche das Substrat bis zu den ersten niedermolekularen Abbauprodukten zerlegt, und die weiteren Stufenenzyme nun nach diesen neuen Substraten, so Cellulase—Cellobiase, Amylase—Maltase etc. Dabei ist wieder die erste Bedingung, daß diese Enzyme für den Pectinabbau specifisch sind; und auch hier steht das wiederum nicht fest.

Die erste Phase scheint die Abspaltung der esterartig gebundenen Methylgruppe zu sein. Dies ist die Voraussetzung der Gelirung von Obstsäften u. dergl.; denn an das dadurch freigewordene Carboxyl treten nun Ca-Ionen und bilden die unlöslichen Kalksalze der Pectinsäure; oder vielmehr überwiegend bereits der Pectolsäure, denn parallel damit gehen auch die weiteren Abspaltungen der Nebengruppen, und grade die Pectolsäure bildet eben mit Ca die typischen gallertartigen Salze (F. EHRLICH, H.W. Bd. III, S. 920). Aber entscheidend ist es, daß überhaupt die Methylgruppe abgelöst und das Carboxyl frei wird.

Die gelirenden Niederschläge sind also verschiedene Mischungen von Ca-Salzen der Pectolsäure selbst mit teilweise noch die Seitengruppen tragenden Salzen der Pectinsäure, und danach sind ihre Eigenschaften verschieden. Die Bedeutung der Erdalkalien für die Gerinnung und das Auftreten freier Säure hat KOPACZEWSKI **220)** beobachtet.

Mit diesem von v. FELLENBERG **221)** erbrachten Nachweis des Zusammenhanges zwischen Methanol-abspaltung und „Koagulation" ist auch das Problem der besonderen „Pectase" gelöst, jenes spezifischen „koagulirenden" Enzyms der Obstsäfte etc., dessen Sondernatur wir schon im H.W. S. 760 als höchst zweifelhaft angesprochen hatten. Da aber das Methanol abspaltende Enzym jedenfalls vorhanden und nach v. EULER (*l. c. 878*) jedenfalls für die Gelirung verantwortlich ist, so kann man mit EHRLICH **209)** ihm den Namen Pectase lassen. Andererseits ist vielleicht eine besondere Benennung überhaupt — wenigstens systematisch — nicht notwendig, da es sich bei dieser Teilwirkung um eine ganz einfache Esterase-Wirkung handelt, eine „Pecto-lipase"-Wirkung, die nach Versuchen von WILLAMAN bei v. EULER **222)** in gleicher Art durch Phytolipasen (aus *Ricinus*) hervorgerufen werden kann. Auch KERTESZ **222a)** gibt an, daß ganz typische Esterasen aus Pektin ein Gel bilden (*Ricinus*, Pankreas).

Nach NEUBERG **223)** spaltet diese Esterase (aus Tabak) auch Methylweinsäure unter Abgabe von Methanol, ebenso die aus Taka; das Calciumtartrat scheidet sich dann unlöslich ab. Es handelt sich also hier wohl nicht um ein spezifisches Ferment, und der besondere Name „Pectin-demethoxylase" (KERTESZ) ist überflüssig. Es greift z. B. auch den synthetisch hergestellten Methylester der α, 1-Methyl-galacturonsäure an **(224)** unter Freisetzung von Methanol (Pectase aus *Medicago sativa*).

$$\begin{array}{l} CHOH \cdot COO \cdot CH_3 \\ | \\ CHOH \cdot COOH \end{array},$$

Untersuchungen über die Beziehungen der Gelirung zur Pectasewirkung mehr praktischen

---

220) ***W. Kopaczewski***, Coag. de la pectine. Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 419 (1925). — 221) ***Th. v. Fellenberg***, Konstitution der Pektinkörper. Bioch. Zs., **85**, 118 (1918). — 222) ***H. v. Euler***, Chemie der Enzyme III. Aufl. II, 1, 457. München 1928. — 222a) ***Z. I. Kertesz***, Esterase char. of pectase. Jl. Amer. Chem. Soc., **55**, 2605 (1933). — 223) ***C. Neuberg, Cl. Ostendorf***, Modell für die Pectase. Bioch. Zs., **229**, 464 (1930). — 224) ***F. Ehrlich, R. Guttmann***, Z. K. der d-Galacturonsäure. Ber. Chem. Ges., **66**, 220 (1933). S.A.

Zieles MEHLITZ 225/6). Nach PHILLIPS 227) soll die Magenschleimhaut von Kühen ein aus Lignin Methoxyl abspaltendes Enzym führen.

In der Gruppe der Pectinasen stecken dann noch ein Acetyl abspaltendes Enzym, wahrscheinlich auch eine nicht ausgesprochen specifische Esterase; und ein die Arabinose + Galactose abspaltendes; hier könnte es sich einfach um eine Galactosidase handeln; jedenfalls kann man annehmen, daß für beide Zucker dasselbe Enzym am Werke ist, und wiederum dasselbe, welches das bereits durch Kochen losgelöste Arabosan spaltet. Diese Enzyme sind noch nicht genauer erforscht.

Das zweite — oder dritte, wenn auch die „Propectinase" bereits ein specifisches Enzym ist — Hauptferment ist dann die **Pectolase** (217, 228), welche das aus 4 Galacturonsäuren aufgebaute Kerngerüst der Pectolsäure in Galacturonsäure spaltet und damit die Hydrolyse der Pectine zu Ende führt. Sie entspricht der „Pectinase", WILLAMAN's (l. c. 219). Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieses Enzym specifisch ist wenngleich ein Beweis dafür, daß es sich nicht doch einfach um eine Galactosidase handelt, noch nicht durch präparative Trennung dieses Fermentes geführt ist. Nach seiner Quelle ist darüber noch nichts vorweggenommen. Es findet sich wieder an den üblichen Orten, in Samen (Diastase, Emulsin) und in Schimmelpilzen. In den Schimmelpilzen geht die Stärke der Wirkung stets parallel vom Angriff des nativen Pectins an bis zur freien Galacturonsäure.

Auch die freie Pectolsäure wird trotz ihrer schweren Löslichkeit von dem Enzym praktisch vollständig zu Galacturonsäure aufgespalten (228); aber die rohe wegen besserer Löslichkeit schneller als die vollkommen reine. Die enzymatische Spaltung eignet sich besonders gut zur präparativen Darstellung der Galacturonsäure (229). — 1 Methylgalakturonsäuren (α und β) werden nicht angegriffen (224).

Das Enzym wird zur Klärung von Fruchtsaften verwendet, und z. B. als *Filtragol* technisch aus Schimmelpilzen hergestellt (s. z. B. MEHLITZ 231)). Filtragol enthält auch kräftige Proteasen (LÜERS 232)).

Über die **Enzyme selbst** ist noch sehr wenig bekannt. Die Umwandlung von Pectolsäure in Pectolactonsäure vollzieht sich am besten bei neutraler Reaktion, der weitere Abbau zwischen ph = 4,5—6,3 (217).

Herstellung von Pectase aus *Medicago sativa* MEHLITZ (l. c. 225). Saft nach 22 h Stehenlassen zentrifugirt, filtrirt. Alkoholfällung, gelöst, wieder gefällt. Ultrafilter mit 0,2 μ Porenweite eignet sich zur Konzentrirung. **Methodisch** sind Angaben von LÜERS 232) von Interesse, daß man die Wirkung der Pectolase viscosimetrisch gut messen kann. — Zur Theorie der Viscosität bei Pectinlösungen GLÜCKMANN 233).

ph-Optimum für Pectase 4,8—5.0 (MEHLITZ, l. c. 225). Einfluss von **Salzen:** alle Sulfate hemmen Propektinase, aber weniger, wenn das betr. Salz schon in sehr geringer Menge in der Nährlösung vorhanden war (*Botrytis cinerea*). Es hemmen bei den Sulfaten (zunehmend): Na, K, Mn, Mg, F, Zn, Cu (234).

---

225) ***A. Mehlitz***, Pectase-Wirkung. Bioch. Zs., **221**, 217 (1930), **256**, 145 (1932). — 226) ***A. Mehlitz, M. Scheuer***, Enz. Klär. von Fruchtsäften etc. ibid., **268**, 344 (1934). — 227) ***M. Phillips c. s.***, Demethoxylation of lignin in the animal body. Proc. Soc. Exp. Biol., **26**, 320 (1929). — 228) ***F. Ehrlich, R. Guttmann, R. Haensel***, Pectinfermente III. Bioch. Zs., **281**, 93 (1935). S.A. — 229) ***F. Ehrlich, R. Guttmann***, Präp. Gew. der d-Galacturonsäure aus Pektin. ibid., **259**, 100 (1933). S.A. — 231) ***A. Mehlitz***, Enzymat. Klärung von Süßmosten etc. Zs. Unt. Lebensm., **68**, 91 (1934); BPh **82**, 243. — 232) ***H. Lüers, A. Löther***, Viscosim. Verfolg. von Enzymreakt. Ws. Brau, **52**, 49 (1935). S.A. — 233) ***S. Glückmann***, Entstehung der Pectingallerte. Koll. Zs., **55**, 64 (1931). — 234) ***D. Rabinowitz-Sereni***, Eff. di alc. sali sull' att. d. pectinasi etc. Ann. di Bot., **20**, 349 (1934); BPh **85**, 297.

Vorkommen. Wie bereits im H.W. S. 760 angedeutet, kommen pectinzerlegende Enzyme weit verbreitet vor, so in Samen und allerlei Mikroben, die auch bei sehr wichtigen technischen Prozessen mitwirken.

Alle diese Enzyme finden sich auch in käuflicher Diastase und im Mandel-emulsin etc., aber in schwacher Wirkung. Wesentlich besser ist die Wirkung von *Aspergillus Oryzae*, von *Penicillium glaucum*, sowie *Rhizopus*. Weitere Angaben über Vorkommen der 3 Enzyme in Malz, Pollen, Kleeblättern, Schimmelpilzen bei WILLAMAN (l. c. 219). Am stärksten pectinlösend *Bac. carotovorus* und *Rhizopus tritici*. Besonders stark wirkt nach PITMAN **235)** ein Schimmelpilz *Pythium*; Hefen garnicht, *B. aceti* sehr schwach wirksam. — Pectinlösung durch *Sclerotinia cinerea* MUHLEMAN **236)**; nach SLOEP **237)** soll grade bei dieser Protopektinase fehlen; WILLAMAN (l. c. 219) fand hier ebenfalls keine Protopectinase, wohl aber Pectase.

Die kräftigste Enzymwirkung fand EHRLICH **217)** bei einem Schimmelpilz *Penicillium Ehrlichi*; auf Rübenbrei gezüchtet. Eine Enzymlösung ließ sich aus dem mit Toluol behandelten Mycel durch Filtration und Alkoholfällung gewinnen.

Bei der Fermentirung des Tabaks spielt die enzymatische Umwandlung der Pectine durch zelleigene Enzyme eine wesentliche Rolle, die NEUBERG c. s. **238—240)** untersucht haben, besonders charakteristisch ist die Abspaltung von Methanol. Dasselbe gilt für die Fermentirung des Kaffees. Die Bohnen enthalten 0,07 % Pectin, die durch ein zelleigenes Enzym beseitigt werden (PERRIER **241)**).

Auch *Helix*-saft enthält sehr wirksame Pectolase (**217, 241a)**) neben den anderen Pectinasen.

II. Alginasen.

§ **423.** Es handelt sich hier um einige Polyosen der Algen, über die noch relativ wenig bekannt ist. Einerseits enthalten Algen (Rotalgen und Grünalgen) Glykogen und somit auch Amylasen (S. 455); andererseits kommt Galactose vor in Form eines Glycerol-α-galactosids (COLIN, S. 257), auch Xylan ist beobachtet worden. Dem entspricht, daß auch Glucuronsäure in Form von Polyuroniden gefunden ist.

SCHMIDT **242)** fand in *Fucus serratus* ein der EHRLICH'schen Poly-galacturonsäure sehr ähnliches Gebilde in 2 Formen, von denen die eine bei der Hydrolyse mit verd. Säuren d-Glucuronsäure liefert, die andere nicht gespalten wird. — Über Glucosebildung aus dem Laminarin durch ein zelleigenes Ferment und Malzdiastase s. H.W. S. 761. Die Spaltung des Laminarins zu ausschließlich Glucose (durch Säuren) hat COLIN **243)** erneut bestätigt. Über enzymatische Spaltung habe ich neue Mitteilungen nicht gefunden; die SCHMIDT'sche Annahme von Glucuronsäure durch Analyse eines Cinchonin-Salzes ist nach BIRD **246)** unrichtig.

Alginsäure. Neben diese zerstreuten Beobachtungen über andere Polyosen und Polyuronide in Algen ist nun in neuerer Zeit als genauer umschriebener Befund der Nachweis eines besonderen Polyuronids getreten, das in vielen Algen der Haupt-

---

235) ***G. A. Pitman, W. V. Cruess,*** Hydrol. of pectin by var. microorg. Ind. Eng. Chem., **21**, 1292 (1929). — 236) ***G. W. Muhleman,*** Pectinase of sclerotinia cinerea. Bot. Gaz., **80**, 325 (1925); BPh **35**, 59. — 237) ***A. C. Sloep,*** Pektinsubst. und die enzym. Zersetz. Diss. Delft 1928 (Holl.); BPh **50**, 725. — 238) ***C. Neuberg, M. Kobel,*** Vorgänge im ... Tabakblatt etc. (Pectine). Bioch. Zs., **179**, 459 (1926), **229**, 455 (1930). — 239) ***C. Neuberg, B. Ottenstein,*** Übertritt von Methylalkohol in den Tabakrauch. ibid., **188**, 217 (1927). — 240) ***Th. Andreadis,*** Vorg. bei der Tabakferm. Bioch. Zs., **211**, 378 (1929). — 241) ***A. Perrier,*** Pectinase dans la ferm. du café. C. R., **193**, 547 (1931). — 241a) ***H. Colin, A. Chaudun,*** Hydr. diast. du tiss. intercell. C. R. 201, 407 (1935). — 242) ***E. Schmidt, F. Vocke,*** Polyglykuronsäuren. Ber. Chem. Ges., **59**, 1585 (1926). — 243) ***H. Colin, P. Ricard,*** Laminarine des laminaires. C. R., **188**, 1449 (1929).

bestandteil ist, und aus **d-Mannuronsäure** aufgebaut ist, der Alginsäure. Die Fucose stammt nicht aus der Alginsäure (**246**).

NELSON c. s. **244/5)** haben reine Alginsäure aus *Macrocystis pyrifera* und *Fucus serratus* gewonnen; ihr Spaltprodukt ließ sich durch Oxydation in Mannozuckersäure umwandeln, und wurde später **245)** als Mannuronsäure identificirt. Gleichzeitige Bestätigung BIRD **246)** an *Laminaria sp.* Verbesserung der Darstellung, Isolirung der freien Säure, Trennung der α- und β-Form SCHOEFFEL und LINK **246a)**.

Das Enzym **Alginase** fand OSHIMA **247)** im Jecur einiger Wirbelloser, die Algen fressen, so bei der Muschel *Haliotus giganteus Gm.* und dem Seeigel *Strongylocentrotus intermedius Ag.* Es fehlte bei allen anderen Seetieren, soweit sie nicht Algenfresser sind, sowie in der Taka, WAKSMAN **248)** hat das Enzym aus autolysirten Bakterien dargestellt.

OSHIMA konnte seine Wirkung viscosimetrisch messen, **opt. ph** = 7,2, WAKSMAN fand 7,0. Opt. Temp. 40°. Die ganz besondere Specifität dieses Enzyms konnte an Mikroben WAKSMAN **249)** bestätigen. Pilze und Actinomyceten, die intensiv Cellulose u. dgl. angreifen, sind auf Alginsäure ohne Wirkung. Bakterien greifen sie an, für einige ist sie die wichtigste Nahrungsquelle. Beschreibung 4 neuer Alginsäure-Bakterien aus Meerwasser und Boden. Die Spaltung soll nicht bis zu monomerer Mannuronsäure gehen (Stufen wie beim Pectin??). Opt. ph. 7,0.

Anhang zum IX. Hauptteil Polyasen.

§ 424. An dieser Stelle seien einige Beobachtungen untergebracht, die noch nicht klarzustellen sind. Einerseits die alte Angabe (H. W. S. 761), daß es ein specifisches Ferment Gelase gäbe, welches ein besonderes KH (Gelose) des Agar-Agar spaltet. Und zweitens einige Angaben über immunspecifische Kohlenhydrate bei Bakterien und bei den Blutgruppen-Antigenen. Da diese sicherlich eine biologische Rolle spielen, so wird es auch specifische Enzyme für sie geben; aber dies ist noch unerforscht, es liegen nur einige wenige, aber interessante Beobachtungen vor.

Gelase. Die Spaltung des Agar-agar von *Gelidium corneum Lamour*, einer ostasiatischen Alge, ist immer noch nicht aufgeklärt. Es ist noch nicht einmal unbestritten, ob die Schwefelsäure hier wirklich fest gebunden ist, denn im Gegensatz zu allen anderen Angaben konnte BUTLER **250)** Agar frei von Schwefel darstellen. Wohl aber fand er in Carragheen (*Chondrus crispus*) ein saures Sulfat eines KH, mit K und Ca als Kationen (28 % SO_4), das er für nicht einheitlich ansieht. HOFFMANN u. GORTNER **251)** erhielten in Bestätigung älterer Angaben durch Elektrodialyse von Agar eine Agarsäure in freiem Zustande (Entfernung des Ca). Diese ist ein Schwefelsäure-Ester einer Polyose mit einem Molg. von ca. 3000. TAKAHASHI **252)** erhielt durch partielle Hydrolyse (130° unter Druck) zwei Produkte: eine normale Polyose

---

244) ***W. L. Nelson, L. H. Cretcher,*** Alginic acid etc. Jl. Amer. Chem. Soc., **51**, 1914, **52**, 2130 (1929/30). — 245) ***W. L. Nelson, L. H. Cretcher,*** d-Mannuronic acid lactone. ibid., **54**, 3409 (1932). — 246) ***G. M. Bird, P. Haas,*** Cell wall const. of Laminaria. Biochem. Jl., **25**, 403 (1931). S.A. — 246a) ***E. Schoeffel, K. P. Link,*** Prepar. of d-mannuronic acid etc. Jl. of Biol. Chem., **95**, 213 (1932), **100**, 397 (1933). — 247) ***K. Oshima,*** Alginsäure spalt. Enz. etc. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan., **7**, 17 (1931); ausführl. (Jap.). ibid., **7**, 332; BPh **68**, 770. — 248) ***S. A. Waksman, M. C. Allen,*** Decomp. of alginic acid by bact. Jl. Amer. Chem. Soc., **56**, 2701 (1934). — 249) ***S. A. Waksman c. s.,*** Bact. decompos. alginic. acid. Jl. of Bact., **28**, 213 (1934); BPh **83**, 416. — 250) ***M. R. Butler,*** Polysacch. compl. extr. from a marine alga. Biochem. Jl., **28**, 759 (1934); BPh **84**, 186. — 251) ***W. F. Hoffmann, R. Aiken Gortner,*** Electrodial. of agar. Jl. of Biol. Chem., **65**, 371 (1925). — 252) ***E. Takahashi, K. Shirahama,*** Ether. sulphate, ess. const. of agar-agar. Jl. Fac. Agr. Sapporo, **35**, 101 (1934); BPh **81**, 418.

(rotbraune Jodfärbung), ein Galactan; ferner einen Schwefelsäure-ester Kantensäure, die keine Jodreaktion gibt und bei der Hydrolyse 40 % Galactose liefert, neben 8 % H_2SO_4 und 8 % Pentose. Auch der Schleim von *Laminaria*, *Fucus* u. a. (Fucoidin KYLIN's) ist ein Schwefelsäureester (BIRD, l. c. 246).

Über die enzymatische Spaltung durch Bakterien habe ich nichts Neues auffinden können. Wahrscheinlich wirkt erst eine ganz normale Sulfatase, dann eine Galactanase. Ein specifisches Ferment anzunehmen ist wohl nicht nötig.

Immunspecifische Kohlenhydrate. Daß bei vielen Immunreaktionen höhere KH mitwirken, ist insbesondere durch die Arbeiten von AVERY und HEIDELBERGER bekannt und hier nicht näher zu erörtern, es muß auf die Specialwerke verwiesen werden, die ihrerseits wieder bei SACHS **253)** und PUTTER **254)** citirt sind. Die isolirten Polyosen sind allerdings keine Voll-antigene, sondern nach LANDSTEINER nur Haptene; d. h. sie reagiren zwar in der typischen Weise mit den Antikörpern, die sie specifisch binden, aber sie erzeugen im lebenden Organismus keine Antikörper. Dazu werden sie erst entwickelt, wenn sie in natürlicher oder experimenteller Bindung mit Proteinen vorliegen.

Bei den specifischen KH gelingt es meist nicht — wie dies bei lipoiden Haptenen möglich ist — durch einfaches Mischen mit Eiweißantigenen ein Voll-antigen zu kombiniren. (Lit. auch bei LEVINTHAL **255**)). In einigen Fällen ist es auf Umwegen — über Koppelung des KH an ein aromatisches Amin, Diazotirung und Koppelung mit Protein — gelungen. Bei gewissen Typen dieser Bakterien ist das KH mit entscheidend für die Infektion, auch die Anaphylaxie (Lit. bei FRANKEL **256**)), die Präcipitinreaktion etc. Die KH sind hier entscheidend für die Specifität der Type, das Protein (im Voll-antigen) für die Art. Auch andere Bakterien enthalten KH, die irgendwie serologisch zu kennzeichnen sind, bei denen aber die Erforschung noch im Rückstand ist. Auch das „heterogenetische Antigen" FORSSMAN's enthält ein KH.

Was hier vorliegt, ist im Einzelnen noch nicht zu sagen. Wohl aber kann man allgemein annehmen, daß es sich auch hier um Symplexe handelt. Bei den „eiweißfreien" Haptenen, — die aber z. T. noch N enthalten —, könnte man daran denken, daß wie bei den Enzymen die eigentliche Wirkgruppe im Symplex gegenüber den analytischen Zahlen des KH als Pheron verschwindet; und beim Voll-antigen tritt zu dem ersten Symplex: Agon + KH noch der secundäre Symplex mit einem Protein hinzu. Dieser neue Symplex mit völlig umgewandelter biologischer Wirksamkeit ist es eben, der meist nicht durch einfache Mischung aufgebaut werden kann, sondern nur mit chemischen Mitteln direkter Kuppelung (LANDSTEINER).

Die KH an sich sind für die einzelnen Typen deutlich verschieden, so enthalten bei Pneumococcen die Typen I—IV je nachdem Galacturonsäure, Glucose, Glucose + Aldobionsäure, Aminozucker + Essigsäure (Chitin?) und noch weitere (HEIDELBERGER **257**)). AVERY u. GOEBEL **258**) fanden in Type I eine Acetylpolyose, die bei Abspaltung der Essigsäure ihre Spezifität verliert. Andererseits können auch pflanzliche KH als „Haptene" erscheinen, so aus Gummi arabicum, aus Agar-agar, indem sie mit Pneumococcenserum reagiren; und auch das durch Bakterien aufgebaute schleimige „Dextran" wirkt ähnlich (Lit. l. c. 254).

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß es die als rein zu betrachtenden KH an sich sein sollten, die als Träger so feiner immunologischer Specifitäten auftreten, um danach 4 Stämme von Pneumococcen serologisch zu unterscheiden. Sie sind eben wahrscheinlich an sich nur Träger, und spezifisch sind nur die entstehenden Symplexe, sei es daß schon das Hapten als solches

---

253) ***H. Sachs,*** Antigene und Antikörper. Hb. d. Bioch. Erg. Werk, Bd. I, S. 973, Jena 1933. — 254) ***E. Putter,*** Antikörper gegen Biokolloide. ibid., ibid., S. 1047. — 255) ***W. Levinthal,*** Struktur der bakt. Antigene. Cbl. Bact., **110** (Beih.), 80 (1929). — 256) ***M. Frankel,*** Anaphylaxie etc. Hb. der Bioch. Erg. W., Bd. I, S. 1009. Jena 1933. — 257) ***M. Heidelberger, F. E. Kendall.*** Polysacch. of type IV, Pneumococci. Jl. of Exp. Med., **53,** 625 (1931). — 258) ***O. T. Avery, W. Goebel,*** Acetyl Polysacch. of Pneumoc. Type I. Jl. of exp. med., **58,** 731 (1933).

eine specifische Wirkgruppe besitzt, wie wir es bei den bakteriellen Haptenen annehmen können; sei es, daß das KH nur aus dem Immunserum heraus bestimmte Stoffe symplexmäßig bindet, wie man es für die KH höherer Pflanzen und das Dextran annehmen kann.

Genaueres darüber ist noch nicht bekannt, und würde uns hier auch zu weit führen. Uns interessirt hier nur, daß diese Symplexe irgendwie durch Enzyme zerstörbar sein müssen, und daß solche Vorgänge bei dem Kampf zwischen pathogenen Mikroben und ihren Wirten eine Rolle spielen müssen. Dafür liegt, soweit ich sehen kann, bisher nur eine wichtige Beobachtung vor. Wie erwähnt, besitzen die verschiedenen Typen des *Pneumococcus* I—IV ganz verschiedene KH. Eins davon ist das scharf definirte unlösliche, linksdrehende Polysaccharid der Type III. Es ist frei von N und liefert bei der Hydrolyse neben Glucose eine Aldobionsäure. DUBOS und AVERY **259, 260)** haben nun ein Bakterium, *Bacillus S. III*, aus Torfboden isolirt und gezüchtet, und zwar auf einem Nährboden, der grade dieses KH resp. die Aldobionsäure als einzige C-Quelle enthielt. Dieser Bacillus greift dieses Polysaccharid an, und zwar durch ein specifisches Enzym; dasselbe Enzym zerstört auch die Kapsel lebender Bakterien und schützt vor der Infection. Geringe Mengen Hefenextrakt im Nährboden ergeben bessere Enzymausbeute. Das Enzym läßt sich adsorbiren, Elution aber nicht gelungen. Anreicherung durch Ultrafiltration, bei der das Enzym zurückgehalten wird. Opt. ph ca. 7 (6,2—7,8). Das durch Adsorption an Al-Hydroxyd C von einem Giftstoff befreite Enzym heilt bei der Injection tötlich infizirte Kaninchen. Die intakte Kapsel ist also für die Virulenz erforderlich (**261**). Das Enzym ist absolut specifisch, greift die KH der anderen Pneumococcen-typen nicht an.

Kohlenhydrate der Blutgruppen. Bei den gruppenspecifischen Substanzen des menschlichen Körpers spielen ebenfalls KH mit. SCHIFF **262)** hat eine der Blutgruppe A zugehörige Substanz z. B. im Harn (auch Blut, Speichel etc.) erst serologisch nachgewiesen (in Bestätigung einer Mitteilung von YOSIDA) und dann rein chemisch als KH identificirt. Daneben finden sich im Harn auch specifische Proteine. Auch in der Magenschleimhaut (käufliches Pepsin) fand SCHIFF **263, 264)** (l. c. 268) ein Schleimsäure lieferndes Polysaccharid als A-Substanz, schwächer im Pankreas.

Dieses KH haben FREUDENBERG u. EICHEL **265)** genauer untersucht. 1000 l Harn ergaben 6—12 g einer farblosen amorphen, leicht in Wasser, Glycerol und Ameisensäure löslichen Substanz, die 5 % N enthält, sowie 10 % Acetyl, und zwar wahrscheinlich am N. Bei Behandlung mit n-Alkali bei 60° schnelles Verschwinden der serologischen Reaktion, gleichzeitig Zunahme des Amino-N auf 50 % des Gesamt-N, durch Freilegung infolge Abspaltung des Acetyls. Re-acetylirung stellt die Wirkung wieder her. Hydrolyse zerstört die Specifität; Abbauprodukt großenteils Galactose, ferner Glucosamin. Die Substanz besteht also aus einem System von Galactose + N-Acetylglucosamin; daneben muß noch ein N-reicher Anteil vorhanden sein. Es gehört in dieselbe Klasse wie das KH aus Type I der Pneumococcen (l. c. 258). Andererseits erinnern diese Stoffe an den „Eiweißzucker" und an Mucoide aus Blutserum und Eierklar. Diese A-Substanz ist nur ein Teil der für die Blutgruppe charakteristischen Substanzen; dieselbe Substanz findet sich auch im Harn bei Blutgruppe Null und B. Auch in Paratyphusbakterien findet sich nach EISLER **266)** eine Quote der A-Substanz; sie wird vom Ferment der Faeces (s. u.) nicht beeinflußt.

---

259) ***R. Dubos, O. T. Avery,*** Decomp. of the caps. polysacch. of pneumoc. III by a bact. enz. Jl. of Exp. Med., **54,** 51 (1931). — 260) ***R. Dubos,*** Yield of spec. enz. in cult. of the bac. decompos. the caps. polysacch. of type III pneumoc. ibid., **55,** 377 (1932). — 261) ***K. Goodner, R. Dubos, O. T. Avery,*** Act. of a spec. enz. upon . . . infect. . . . with type III pneumococcus. ibid., **55,** 393 (1932). — 262) ***F. Schiff,*** Gruppenspecif. Subst. des menschl. Körpers. Jena 1931. — 263) ***F. Schiff, G. Weiler,*** Ferm. u. Blutgruppen. Bioch. Zs., **235,** 454 (1931). — 264) ***F. Schiff,*** Grundlagen der Blutgruppenlehre. D. Med. Ws., **1933,** 199. — 265) ***K. Freudenberg, H. Eichel,*** Spec. Kohlenhydr. der Blutgruppen. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **510,** 240, **518,** 97 (1934/5). S.A. — 266) ***M. Eisler,*** Verh. bakt. Blutantigene etc. gegen Stuhlauszüge. Zs. Immun., **75,** 418 (1932).

Die **enzymatische Spaltung** gelingt durch Enzym aus *Helix*; Amylasen sind ohne Wirkung, ebenso Emulsin, Taka, Papain. Blutgruppenferment: Nun existirt aber nach SCHIFF **263)** ein Enzym, das alle serologischen Merkmale vernichtet, also die specifische Substanz zerlegt; aber eine Beziehung zu diesen genauer bekannten KH ist noch nicht hergestellt. Es findet sich in den Faeces (bakteriell?); aber auch im Speichel und in der Placenta. Mit der Speichelamylase hat es — entsprechend den Angaben FREUDENBERG's für die Polyose — nichts zu tun **(267)**.

Nach STIMPFL **268)** lassen sich durch ihre Thermoresistenz zwei gegen A und B verschiedene Enzyme unterscheiden, A wird bei 58° zerstört, B erst bei 61° in 30'; gegen chemische Einflüsse keine Verschiedenheiten. Opt. ph ca. 6. Unempfindlich gegen Aceton und Urethan, Schwermetallsalze vernichten.

Nachträge zum IX. H. T.

Zur Frage: **Kettenlänge bei der Stärke (S.S. 338, 350, 377).**

Bezüglich der Ansichten STAUDINGER's ist mir eine kurze Bemerkung entgangen, welche für die Beurteilung seiner Auffassung nicht unwichtig ist. Ich habe S. 338 nur allgemein ausgesagt, daß STAUDINGER die Stärke betr. noch kein endgiltiges Urteil über die Kettenlänge abgibt. In seiner Arbeit mit O. SCHWEITZER **269)** sagt er aber genauer, daß die Messungen der spec. Viscosität von Stärkelösungen keine Entscheidung über die Existenz von Makromolekülen zulassen; daß man annehmen kann, daß *„nicht Makromoleküle, sondern Molekül-Aggregate, also Micellen vorliegen"*.

Zu dieser Frage liegen nun aus neuester Zeit wichtige Arbeiten von HAWORTH c. s. **269a—269c)** vor, die diese Ansicht STAUDINGER's bestätigen. Sie haben an verschiedenen Stärkepräparaten und Abbauprodukten neue Messungen angestellt, indem sie die Methode der Endgruppenzählung mit der Viscosimetrie nach STAUDINGER verglichen haben. In allen Fällen sprechen ihre Ergebnisse zu gunsten der reinen fortlaufenden Glucopyranose-Kette, gegen eine Kette mit anhängenden Seitenketten.

Bei gewöhnlicher Stärke ergab die Endgruppenzählung ein Molgew. von ca. 5000 = 25 Glucosen, während die Viscositätsmessungen an acetylirter und methylirter Stärke von 4000—35000 schwanken. Eine **Amylose**, hergestellt mit 0,5 %iger alkoh. HCl, ergab in frischem Zustande acetylirt und methylirt eine mit dem chemisch bestimmten Molg. von 5000 übereinstimmende Viscosität. Die Amylose wird beim Trocknen unlöslich in Wasser, reaggregirt also. **Amylopectin** aus Kartoffelstärke bestand nach der Endgruppenzählung aus 16—17 Glucosen. Die Viscos. Messung der Acetate ergab Aggregate von 40 bis zu > 80 Glucosen, Pyridin befördert die Aggregirung; beim Methyliren trat einmal kein Zerfall ein, meist aber bedingt fortschreitende Methylirung Zerfall, wie sich aus den Drehwertänderungen ergibt. **Glykogen** zeigt nicht diese Neigung zur Association; kein Zusammenhang mit dem P-Gehalt. Amylose und Amylopectin bestehen also aus kurzen und aggregirten Ketten; alle physikalischen Methoden, Viscosimetrie, osmot. Druck, Ultrazentrifuge, geben nur das Aggregat, nicht die Molgröße. Die Autoren übertragen diese Ergebnisse auf die **Cellulose**.

---

267) ***O. Sievers***, Geh. des Speichels an sog. Blutgruppenferm. Klin. Ws., **1934,** II, 1640. — 268) ***A. Stimpfl***, Blutgruppenfermente. Zs. Immun., **76,** 159 (1932). — 269) ***H. Staudinger, O. Schweitzer***, Viscos. Mess. an Polysacch. etc. Ber. Chem. Ges., **63,** 2317 (2325) (1930). S.A. — 269a) ***D. K. Baird, W. N. Haworth, E. L. Hirst***, Mol. size of Amylose etc. Jl. of Chem. Soc., **1935,** 1201. — 269b) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, M. M. T. Plant***, Const. and chain-length of some starch dextrins. ibid., **1935,** 1214. — 269c) ***W. N. Haworth, E. L. Hirst, A. C. Waine***, Const. ... of Amylopectin. ibid., **1935,** 1299.

Auch diese besteht aus Aggregaten von Molekülen mit nicht mehr als 200 Glucosen. — Zwei **Dextrine** bestehen ebenfalls aus einfachen Ketten ohne Seitenketten, da Dimethylglucose nicht auftritt. Ein Erythrodextrin ergab 9,4 % Tetramethyl-glucose, hat also 12 Glucosen, scheinbares Molg. (Viscosimetrie) = ca. 2000; ein anderes mit viscos. Molg. ca. 1800 hatte nach der Endgliedzählung 8 Glucosen.

Ferner sind durch ein technisches Versehen bei der Ordnung der Literatur einige Arbeiten nicht berücksichtigt worden; bei der Gelegenheit seien noch einige weitere Ergänzungen gegeben:

zu § 385: Amylasen; Bedeutung des ph.

Ålvik **270)** hat bei einigen Pilz-amylasen die Abhängigkeit der Stabilität und der Wirkung vom ph untersucht. Wegen der Schwerzugänglichkeit des Originals gebe ich seine zusammenfassenden Tabellen hier wieder:

Stabilität.

Amylase von	Deutliche bis völlige Inaktivierung während 60 Minuten bei pH	Stabilitätsoptimum in 24—72 Stunden bei pH	Inaktivierungskonstante für die Inaktivierung bei pH 3,1—3,2 nach monomol. Gesetz berechnet
Aspergillus niger	Nicht merkbar bei 1,8—7,0	3,2—5,5	0,000006
Penicillium S, 11	2,8—1,8	4,8—8,2	0,00020
— *188, c*	2,8—1,8	4,8—7,6	0,00041
Aspergillus oryzae	3,8—2,6	5,3—8,2	0,034
Penicillium S, 23	4,6—3,1	7,0—7,5	1,02

Wirkung.

Amylase von	Wirkungsbereich	Wirkungsoptimum	Rel. Wirkung 50 % bei pH	Die rel. Wirkungsgeschwindigkeitskurven entsprechen Dissoziationsrestkurven mit $p = \frac{1}{2}$ bei pH	
				Säure	Base
Aspergillus oryzae	2,6—7,6	4,0—5,4	3,25 und 6,85	6,85	2,9
— *niger*	1,8—7,0	3,75—5,0	2,8 „ 6,25	6,25	2,6
Penicillium 188, c	1,8—8,2	2,85—5,2	2,35 „ 6,75	6,75	1,6
— *S, 23*	3,0—8,6	4,7—6,0	4,5 7,37	7,37	—

Einfluß chemischer Stoffe auf Amylasen.

Zu § 388. Nach Sen 271) sollen Bromide Speichelam. schon in kleinen Konzz. hemmen. (Stärkeabbau und Zuckerbildung). Nach Giri **271a)** aktiviren bei Amylase von *Ipomoea*

---

270) ***G. Ålvik,*** Stabil. und Wirk. einiger Pilzdiastasen bei verschiedenem ph. Bergens Mus. Årbok **1931**, Nr. 5. S.A. (Orig. deutsch). — 271) ***K. Ch. Sen,*** Infl. of neutral salts on enz. proc. Jl. Ind. Chem. Soc., **5**, 245 (1928). — 271a) ***K. V. Giri c.s.,*** Einfl. von Neutralsalzen auf die enz. Hydrol. von Stärke. Jl. Ind. Chem. Soc., **12**, 273 (1935); Chem. Zbl. **1936**, I, 361.

Abgeschlossen: 28. 1. 36. Ber. Phys. 89. H. 7/8.

NaCl, NaF, Na_2SO_4, $NaNO_3$ bei ph > 6, bei 6 garnicht, bei 4,0 mit der Konz. ansteigend bis zu einem Optimum, dann hemmend.
Ca soll nach KEESER 279) hemmen, Mg in niederen Konzz. fördern. Mineralwässer hat auch GAISSER 278) untersucht (Pankreasam.).

Zu § 390. Fe und Mn aktiviren in kleinen, hemmen in größeren Dosen (HARPUDER 274); 10^{-2} Fe^{II} hemmt total, 10^{-7} ohne Einfluß. Bei Mangan z. T. indirekte Wirkung durch ph-Verschiebung.

Zu § 391. Aethylen soll Pankreasamylase aktiviren (275). — Fumarsäure hemmt stärker als Maleinsäure (COOPER 276)), ebenso Mesaconsäure > Citraconsäure. — PRECHTL 277) hat einige der üblichen Antiseptica bei Speichelam. erneut untersucht. Toluol hemmt bei > 0,2 %, Chloroform > 2 %, Chloralhydrat > 1,5 %, NaF > 1 %, Thymol garnicht.

Zu S. 454. Nach KURSSANOW 278) nimmt die Menge an Amylase in den Blattknospen (von Bäumen) mit dem Aufbruch der Knospen erheblich und regelmäßig zu.

Zu S. 516. **Galactane.** Es ist verabsäumt worden, eines tierischen sozusagen Galactans Erwähnung zu tun, des von MAY c.s. 279) genauer untersuchten **Galactogens.** Es ist schon lange ein linksdrehendes KH aus *Helix* unter dem Namen „Sinistrin" bekannt. MAY isolirte es aus den Eiern und Eiweißdrüsen der Schnecke und zeigte, daß es nur aus Galactose aufgebaut ist.
Es ist leicht löslich in Wasser, gibt keine Jodreaktion. Näheres und enzymtypisches Verhalten noch nicht bekannt.

---

272) ***E. Keeser,*** Einfl. von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ auf ein. Ferm. Arch. für exp. Path., **160**, 663 (1931). S.A. — 273) ***F. C. Gaisser,*** Einfl. von Mineralwäss. auf Diast. Chem. Ztg. **1931**, 299. — 274) ***K. Harpuder,*** Einfl. von Fe- und Mn- Ionen auf Ferm. Bioch. Zs., **193**, 380 (1928). — 275) ***A. D. Hirschfelder, E. T. Ceder,*** Does Ethylene aff. enz.? Amer. Jl. Phys., **91**, 624 (1930). — 276) ***E. A. Cooper, S. H. Edgar,*** Biol. signif. of cis-trans isomerism. Biochem. Jl., **20**, 1060 (1926). — 277) ***E. Prechtl,*** Einfl. der ... Antiseptica auf Speichelamylase. Biol. gener., **4**, 181 (1928); BPh **46**, 126. — 278) ***A. Kurssanow,*** Ferm. in austreib. Blattknospen. Planta, **11**, 75 (1930). S.A. — 279) ***F. May c.s.,*** Galaktogen. Zs. Biol. **91**, 215, **92**, 319, 325, **93**, 233, **95**, 277 (1930/4).

X. Hauptteil.

Nucleasen.

Allgemeines.

§ 425. Auf dem Gebiete der Nucleasen sind Fortschritte von grundlegender Bedeutung nicht zu verzeichnen. Auch die Nomenclatur und Einteilung ist im wesentlichen unverändert geblieben. Unsere Annahme, daß die Enzyme, welche die Nucleoproteide zerlegen, keine besonderen Enzyme sind, hat sich inzwischen zur Gewißheit verdichtet: die Nucleoproteide sind Symplexe von Nucleinsäuren mit verschiedenen Proteinen; und der Zerfall dieser Gebilde ist ohne weiteres zu deuten als der einseitige Abbau eines der beiden Partner durch deren spezifische Enzyme, also je nachdem Proteasen oder Nucleasen. Wir können uns also auf die Spaltung der Nucleinsäuren beschränken, und zwar besprechen wir hier wie im H. W. zunächst nur den hydrolytischen Zerfall der Polynucleotide über die Nucleotide und Nucleoside in die letzten Bausteine: Zucker, Basen und Phosphorsäure. Auch die Nomenclatur kann bestehen bleiben: wir verstehen unter Polynucleotidasen die Enzymgruppe, welche die Nucleinsäuren in Nucleotide zerlegen, wobei zu bemerken ist, daß LEVENE 1) noch an seiner nicht so prägnanten Bezeichnung Nucleinasen festhält; Nucleotidasen und Nucleosidasen entsprechen den specifischen Substraten.

Die einzige vom enzymchemischen Standpunkt aus grundsätzlich wichtige Erkenntnis ist die Gleichsetzung der Nucleotidasen mit dem Begriff „Phosphatase" ganz allgemein betrachtet, wobei wie § 284 betont ebenso wie bei fast allen anderen Phosphatasen noch Raum bleibt für die Annahme gewisser relativer Specifitäten grade zu den Phosphorsäure-estern der Nucleoside. Es ist deshalb durchaus zweckmäßig, neben den alt hergebrachten Namen noch — wie es auch LEVENE tut — den VON DEUTSCH vorgeschlagenen Namen **Nucleophosphatase** zu setzen, um diese Gruppenzugehörigkeit zu betonen. Auf die Behauptung von TAKAHASHI, daß auch die Polynucleotidase nichts anderes sei, als ein Gemisch verschiedener nicht für diese Struktur specifischer Phosphatasen, haben wir S. 107 hingewiesen und kommen bei den Strukturfragen nochmals darauf zurück. Bei den Nucleosidasen ist als wichtigste Entdeckung die der Pyrimidinnucleosidasen durch DEUTSCH zu betrachten; dagegen liegt zur Entscheidung der enzymtypisch so wichtigen Frage, ob die Nucleosidasen für die Nucleoside der Ribose und der Ribodesose verschieden sind, noch kein genügendes Material vor.

Noch nicht endgiltig gesichert, wenn auch recht wahrscheinlich, ist die Sonderexis-

---

1) ***P. A. Levene, L. W. Bass,*** Nucleic acids. New York 1931.

tenz der Nucleosidasen als specifische Fermente überhaupt. Es sind Pentosidasen, und zwar, wenn sie specifisch sind, die einzigen bisher bekannten Pentosidasen; denn weder für Arabinoside noch für Xyloside gibt es eigene Enzyme, die betr. Glykoside werden durch Galactosidasen resp. Glucosidasen gespalten (§ 299), und die Rhamnoside sind nach unseren bisherigen Kenntnissen überhaupt enzymfest. Da ferner in allen anderen natürlichen Pentosiden ebenso wie in den Hexosiden pyroide Zucker vorhanden sind, die Ribose der Nucleoside aber furoid ist, so kann man hier mit großer Wahrscheinlichkeit eigene specifische Enzyme, Ribosidasen, annehmen.

I. Struktur der Nucleinsäuren.

§ 426. An den Grundlagen der Strukturlehre hat sich nichts Wesentliches geändert. Wir unterscheiden nach wie vor die beiden Typen der **Thymonucleinsäure** und der Hefennucleinsäure; resp. wie LEVENE (l. c. 1, S. 260) sie systematisirend zu nennen vorschlägt: **Ribonucleinsäure**; man kann sie auch nach ihrem Hauptvorkommen unterscheiden als **Zoonucleinsäure** und **Phytonucleinsäure**. Dazu kommen dann noch einige abweichende Typen, so die Nucleins. des Tuberkelbazillus und anderer Bakterien, und die Nucl. des Pankreas. Der Unterschied zwischen den beiden biologischen Haupttypen in chemischer Hinsicht beruht auf zwei Grundlagen:

1) sind die Pyrimidine verschieden: Phyton. Cytosin + Uracil, Zoon. Cytosin + Thymin.

2) sind die Zucker verschieden: Phyton. Ribose, Zoon. Thyminose = Ribodesose.

Im übrigen sind die beiden Typen nicht eindeutig biologisch getrennt, da Nucl. mit d-Ribose auch in tierischen Organen vorkommen, z. B. im Pankreas, von dem schon lange bekannt ist, daß aus seiner Nucleinsäure Guanylsäure erhalten werden kann (*l. c. 13, 14*).

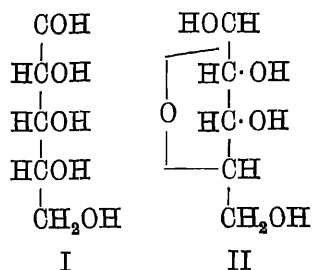
Da die Formeln der entstehenden Stickstoffbasen im H. W. bereits gegeben sind, brauchen wir darauf nicht mehr zurückzukommen. Es gibt also im Ganzen 8 natürlich gebundene **Nucleoside**, dh. Glykoside der Basen mit dem Kohlehydrat:

Adenin, Guanin gebunden an d-Ribose resp. Ribodesose
Cytosin gebunden an d-Ribose resp. Ribodesose
Uracil gebunden an d-Ribose
Thymin gebunden an Ribodesose

Die Namen der 4 an d-Ribose gebundenen Nucleoside sind Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin.

Die anderen 4 sind nicht besonders benannt; der bisweilen angewendete Name Thymidin für das Ribodesosid des Thymins wird von LEVENE neuerdings auch benutzt; ich halte diese Parallelsetzung zum anders strukturirten Cytidin und Uridin für unzweckmäßig; man sollte die Desoside abgesondert halten und deutlich gemeinsam benennen. Vorläufig nennt sie LEVENE meist mit dem korrekten, aber unhandlichen Namen Desoxy-ribose-guanin etc. KLEIN nennt sie Desoxy-ribo-nucleoside, und einzeln entspr. Ribodesose-guanin etc.; dagegen das Ribodesose-Thymin gesondert „Thymosin", wogegen dasselbe Bedenken wie gegen „Thymidin" geltend zu machen ist.

Die Zucker. d-Ribose hat die nebenstehende (offene) Formel (I), gehört sterisch zu zwei nicht natürlich vorkommenden Zuckern, Allose und Altrose; die Entstehung dieses Zuckers ist also ziemlich rätselhaft. ROBINSON hatte deswegen daran gedacht,

daß in den Glykosiden Ribose garnicht vorgebildet ist, sondern erst bei der Hydrolyse durch eine WALDEN-Inversion entsteht; jedoch ist nach LEVENE (l. c. 1, S. 135) die Präexistenz sicher, da aus allen Nucleosiden bei mildester Hydrolyse derselbe Zucker entsteht. Ob die Bindung α oder β ist, ist noch nicht festzustellen gewesen. Dagegen ist die gebundene Ribose sicher < 1,4 >, dh. furoid (II). Es geht dies schon daraus hervor, daß die Ergadenylsäure resp. Inosinsäure (S. 108) die PhS. in 5 gebunden haben (2), hier also die 5-Stellung des Zuckers frei sein muß; die anderen Nucleotide sind zwar in 3 an PhS gebunden (s. u.), aber in allen ist derselbe Zucker enthalten, z. B. geht Adenosin glatt in Inosin über, so daß eine Konfigurationsänderung nicht einzunehmen ist.

```
  COH         HOCH
   |      ┌─────|
  HCOH    │  HC·OH
   |      O     |
  HCOH    │  HC·OH
   |      │     |
  HCOH    └────CH
   |            |
  CH2OH       CH2OH
   I           II
```

Später hat dann LEVENE 3) auch den direkten Beweis der furoiden Natur für Adenosin, Guanosin und Uridin auf dem üblichen Wege geführt über totale Methylirung und Oxydation zu Dimethoxy-bernsteinsäure. Für Thymidin wurde der Beweis der furoiden Struktur über die Tritylverbindung erbracht, wie dies für Uridin schon vorher BREDERECK 4) gezeigt hatte (Trimethyl-phenylchlorid reagirt nur mit primärem OH). Endlich wurde d-Ribose in die Acetonverbindung des Methyl-Ribofuranosids übergeführt und phosphorylirt. Die erhaltene Ribofuranose-5-PhS entsprach der natürlichen aus Inosinsäure (5). BREDERECK 6) hat dann durch die Trityl-Verbindung die furoide Struktur auch für Adenosin und Cytidin erwiesen.

Thyminose, der Zucker der Zoonucleinsäure, ist nach einigen Irrgängen von LEVENE 7) als d-2-Desoxy-ribose (**Ribodesose**) erkannt worden. Sie hat die nebenstehende Formel.

```
  CHO
   |
  CH2
   |
  HCOH
   |
  HCOH
   |
  CH2OH
```

Der freie Zucker, den LEVENE aus den Nucleosiden durch 0,01 n HCl bei kurzem Erhitzen darstellen konnte, ist natürlich pyroid; seine Struktur und Konfiguration ist durch Vergleich mit dem synthetisch hergestellten Antipoden β-1-2 Ribodesose sichergestellt worden. In den Nucleosiden ist der Zucker wie die Ribose furoid, wie am Thymidin nachgewiesen wurde (s. o.), sowie auch an den Desosiden von Guanin und Hypoxanthin (MAKINO 6a)).

Die FEULGEN-Reaktionen. Es sei hier ganz kurz bemerkt, daß diese Desoxypentose das chemische Substrat ist für die VON FEULGEN 1914 entdeckten beiden Farbreaktionen, die „Nuclealreaktionen", die nur der Thymonucl. zukommen. Sie haben an sich eine gewisse Bedeutung, haben aber andererseits in der Strukturdeutung des Zuckers in der Thymonucl. vielfach auf Abwege geführt (8). FEULGEN fand am Hydrolysat von Thymonucl., daß es 1) fuchsinschweflige Säure wieder rotfärbt (SCHIFF'sche Reaktion) und 2) daß es einen Fichtenspan grün färbt, wenn man ihn damit tränkt und dann mit HCl gesättigten Wasserdämpfen aussetzt; dies ist eine Reaktion auf den Furanring. LEVENE und MORI 7) zeigten, daß die Thyminose beide Reaktionen gibt. Andere für Thymonucl. angegebenen Farbenreaktionen sind ebenfalls für den Zucker charakteristisch, mit Indol, resp. Diphenylamin oder Carbazol mit HCl (DISCHE 9, 10)); nach ANGERMANN 11) für alle Nucleoside

2) ***P. A. Levene, T. Mori,*** Struct. of ribophosph. acid. Jl. of Biol. Chem. **81**, 215 (1929). S.A. — 3) ***P. A. Levene, R. St. Tipson,*** Ring structure of adenosine (guanosine) (uridine) (thymidine). ibid. **94**, 809, **97**, 491 (1932), **101**, 529 (1933), **109**, 623 (1935). — 4) ***H. Bredereck,*** Ringstruktur der Pyrimidinnucleoside. Ber. Chem. Ges., **65**, 1830 (1932). — 5) ***P. A. Levene, E. T. Stiller,*** Synth. of ribose-5-phosph. acid. Jl. of Biol. Chem., **104**, 299 (1934). — 6) ***H. Bredereck,*** Ringstruktur der Ribose in der Hefe-nucleins. Zs. phys. Chem., **223**, 61 (1934). — 6a) ***K. Makino,*** Struktur der Desoxyriboside aus Thymusnucl. Bioch. Zs., **282**, 263 (1935). S.A. — 7) ***P. A. Levene, T. Mori (c.s.),*** Ribodesose etc. Jl. of Biol. Chem., **83**, 803 (1929), **85**, 785 (1930). S.A. — 8) ***R. Feulgen,*** Nuclealreaktion und Nuclealfärbg. etc. Zs. phys. Chem. **165**, 215 (1927). — 9) ***Z. Dische,*** Charakt. Farbreaktionen . . . der KH mit Carbazol etc. Bioch. Zs., **189**, 77 (1927). — 10) ***Z. Dische,*** Farbenreakt. der Thymonucl. Bioch. Zs., **204**, 431 (1929); Mikroch., **8**, 4 (1930). — 11) ***M. Angermann c.s.,*** Specif. der von DISCHE angeg. Farbreakt. Zs. phys. Chem., **191**, 123 (1930).

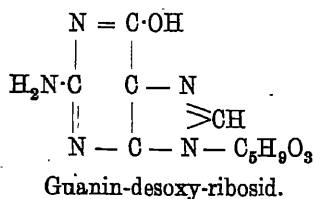
der Ribodesose gleich. Ausbau zur quantit. Mikro-Methode der Bestimmung der Nukleinsäuren mit Diphenylamin (10).

Die einzelnen Nucleoside. Als bereits bekannt sind im H. W. S. 764 angeführt sämtliche **d-Riboside**; die Glykoside der Desoxyribose sind erst später dargestellt worden. Komplette enzymatische Zerlegung der Hefennucl. durch Nucleotidase aus Leber resp. besser Darmschleimhaut BIELSCHOWSKI 12). Cytosin geht dabei größtenteils in Uridin über, weniger Guanin. Dasselbe Ergebnis auch mit Niere MAKINO 13). Die Darstellung der Nucleoside mit **Ribodesose** machte viel größere Schwierigkeiten, da sie bei der Säurehydrolyse stets weiter zerfallen, und auch bei der enzymatischen Hydrolyse schon beim ph der entstehenden PhS zerfallen (14); auch wenn das Fermentpräparat — wie das aus Leber von DEUTSCH 15) hergestellte — Nucleosidase enthält, gelingt keine quantitative Aufarbeitung der Nucleoside; es können nur die weniger empfindlichen Pyrimidinnucleoside dargestellt werden (THANNHAUSER 16)). Erst bei der Verwendung des keine Nucleosidase führenden Extraktes aus Darmschleimhaut gelang die Darstellung aller Nucleoside.

LEVENE 17) isolirte die Ribodesoside des Guanins und Hypoxanthins aus der enzymatischen Hydrolyse von Thymonucleinsäure; sie sind den Ribosiden äußerlich ähnlich, aber doch wegen des anderen Zuckers deutlich unterschieden. Ebenso wurden (18) die Glykoside von Thymin und Cytosin dargestellt. BIELSCHOWSKI und KLEIN 19) erhielten die Nucleoside von Guanin, Hypoxanthin, Thymin und Cytosin mit verbesserter Methodik; das des Cytosins kristallisirt. Adenin-desoxy-ribosid wurde erst später von KLEIN 20) gewonnen; dieses Ergebnis beruhte darauf, daß die Desaminirung durch Ag-Ion ausgeschaltet werden kann, die früher stets das Auffinden des Adenosinglykosids verhindert hatte, an dessen Stelle man eben das des Hypoxanthins fand. Die Nucleinsäure aus Eiter liefert nach BIELSCHOWSKI 21) dieselben Desoxy-riboside wie die Thymonucl.

Die Bindung des Zuckers an Pyrimidin erfolgt in 3 (l. c. 1, S. 158, GULLAND 22)); an den Purinkern in Stellung 7 oder 9; auch die Desoxyriboside verhalten sich nicht anders.

```
     N = C·OH
     |   |
H2N·C    C — N
     ||  |    >CH
     N — C — N— C5H9O3
```

Guanin-desoxy-ribosid.

Der Beweis der Substitution am N wurde dadurch erbracht, daß LEVENE 23) durch Methylirung von Xanthosin Theophyllinribosid (1,3 Dimethyl-xanthin) darstellte, während bei freiem N Coffeinribosid hätte entstehen müssen; dessen Struktur erwiesen durch direkte Synthese des Theophyllinribosids (24). Diese ganze Beweiskette ist nach GULLAND 22) illusorisch, da die Synthese von der Ribopyranose ausgegangen ist. Es bleibt immer noch die Frage übrig, ob 7 oder 9 der Anknüpfungspunkt ist. LEVENE weist darauf hin, daß die Stellungen 7 oder 9 unentscheidbar sind, da eine Tautomerie des Purinkerns vorliegt; GULLAND c. s. 22) glauben aber erwiesen

12) ***Fr. Bielschowski, (Fr. Klemperer)***, Ferm. Aufspalt. der Hefennucl. Zs. phys. Chem., **190**, 15 (1930), **211**, 69 (1932). — 13) ***K. Makino***, Ferm. Aufspalt. der Hefennucl. Zs. phys. Chem., **225**, 147 (1934), **232**, 196 (1935). S.A. — 44) ***S. J. Thannhauser, G. Blanco***, Einw. des ... Duodenalsaftes auf Thymonucl. Zs. phys. Chem., **161**, 126 (1926). — 15) ***W. Deutsch***, Lebernucleotidase. Zs. phys. Chem., **171**, 264 (1927), **186**, 11 (1929). — 16) ***S. J. Thannhauser, M. Angermann***, Ferm. Aufspalt. der Thymusnucl. Zs. phys. Chem., **186**, 13 (1929), **189**, 174 (1930). — 17) ***P. A. Levene, E. S. London***, Guanine desoxypentoside from thymus nucl. acid. Jl. of Biol. Chem., **81**, 711 (1929). — 18) ***P. A. Levene, E. S. London***, Struct. of thymonucl. acid. ibid., **83**, 793 (1929). — 19) ***Fr. Bielschowski, W. Klein***, Ferm. Aufspalt. der Thymusnucl. Zs. phys. Chem., **207**, 202 (1932). S.A. — 20) ***W. Klein***, Adenin-desoxy-ribosid. Zs. phys. Chem., **224**, 244 (1934). S.A. — 21) ***Fr. Bielschowski***, Ferm. Aufspalt. der Eiternucleins. Zs. phys. Chem., **210**, 134 (1932). — 22) ***J. M. Gulland, T. F. Macrae (E. R. Holiday)***, Const. of purine nucl. Jl. of Chem. Soc., **1933**, 662, **1934**, 1639. — 23) ***P. A. Levene***, Act. of diazomethane on xanthosine. Jl. of Biol. Chem., **55**, 437 (1923). — 24) ***P. A. Levene, H. Sobotka***, Theophyllin pentosides. ibid., **65**, 463 (1925).

zu haben, daß im Xanthosin der Zucker in 9 sitzt, und zwar nach den Absorptionsspektren; es wird also für alle Nucleoside 9 als Verknüpfungsstelle angenommen, für Guanin-desoxy-ribosid würde also die nebenstehende Formel gelten.

Ein Ribosid des 2-Oxy-6-aminopurins (Isoguanin) haben CHERBULIEZ c. s. 25) aus den Samen von *Croton tiglium* isolirt und Crotonosid benannt. SPIES 26) hat den freien Zucker als d-Ribose identificirt. Über Enzymspaltung keine Angaben.

Ein Adenin-thiomethylpentosid ist aus Hefe isolirt worden (SUZUKI c. s. 27)). LEVENE 28) hat seine Structur aufgeklärt. Danach ist der Zucker eine < 2,5 > Ketopentose mit einer Methylgruppe, wahrscheinlich als $S \cdot CH_3$ in 3. Über enzymatische Spaltung keine Angaben. — Über einige weitere frei gefundene Nucleoside aus Blut, Geweben etc., über die keine genaueren Angaben vorliegen, auch nicht in bezug auf enzymatische Spaltung s. l. c. 1, S. 185.

§ 427. **Nucleotide.** Unter Nucleotiden wollen wir hier nur diejenigen Glykoside der Purine und Pyrimidine mit den Zucker-Phosphorsäuren verstehen, die eben als Abbauprodukte der Nucleinsäuren auftreten, also ihre Baustoffe sind. Die vereinzelt stehende sog. „**Muskeladenylsäure**" (Ergadenylsäure, t-Adenylsäure) haben wir S. 108 als Substrat der Phosphatasen abgehandelt.

Die Verschiedenheit der beiden Säuren wurde zuerst von LEVENE 1920 und dann von EMBDEN 29) erwiesen und auf die Verschiedenheit der Zucker-PhS bezogen. Das einfachste Unterscheidungsmerkmal ist, daß die Purinaminase SCHMIDT's aus Muskel nur diese „Muskeladenylsäure" angreift und Inosinsäure bildet; nicht aber das Nucleotid aus Hefe. Auch rein äußerlich (F., opt. Aktiv.) sind sie verschieden: ferner wird Hefenadenyls. viel schneller durch Säuren hydrolysirt als die des Muskels. Bequeme Darstellungsmethode aus Muskel OSTERN 29a).

Diese „Muskel-adenylsäure" findet sich im Sarkoplasma; sie hat sicherlich mit den Kern-Nucleinen nichts zu tun, ist vielmehr eine Specialsubstanz des Muskels mit besonderen Funktionen. Sie stellt beim Warmblütermuskel den ganz überwiegenden Anteil aller Purinsubstanzen überhaupt vor, s. z. B. OSTERN (l. c. 92); Guaninkerne fehlen fast völlig. Wir kommen darauf § 436 zurück. Zu ihr gehört als ihr Desaminirungsprodukt die Inosinsäure mit Hypoxanthin als Purinbase. Beide haben auch eine insofern von den echten Nucleotiden abweichende Struktur, als sie eine Ribose-5-PhS-enthalten (l. c. 2). Dagegen sind die Guanylsäuren aus beiden Quellen (Hefe und Pankreas) identisch, wie neben anderen Tatsachen auch aus der Hydrolysen-konstante der Pankreas-guanylsäure (verglichen mit Hefen-guanyls.) hervorgeht (LEVENE 30)); ferner sind Kristallform und Drehung der sekund. Na-Salze gleich (—2,32 resp. —2,42) (ANNAU 31)).

Es gibt also vom Adenin drei Glykoside mit Zuckerphosphaten, davon sind zwei als Nucleotide zu bezeichnen, nämlich die

Adenin-ribose-3-PhS = h-Adenylsäure = Hefenadenylsäure = Synadenylsäure.

Adenin-ribodesose-PhS.

und eine nicht aus den Nucleinsäuren stammende

Adenin-ribose-5-PhS = t-Adenylsäure = Muskeladenylsäure = Ergadenylsäure.

Die Bezeichnung „h"- oder **Hefenadenylsäure** muß aufgegeben werden, da sie auch zweifellos autochthon in tierischen Geweben auftritt, zum mindesten in einem Polynucleotid

25) ***E. Cherbuliez, K. Bernhard,*** Crotonoside. Helv. Chim. Act., **15**, 464 (1932). — 26) ***J. R. Spies, N. L. Drake,*** d-Ribose from the croton bean. Jl. Am. Chem. Soc., **57**, 774 (1935). — 27) ***U. Suzuki c. s.,*** Neuer, schwefelhalt. Bestandt. der Hefe. Bioch. Zs., **154**, 278 (1924). — 28) ***P. A. Levene, H. Sobotka,*** Thio-sugar from yeast. Jl. of biol. Chem., **65**, 551 (1925). — 29) ***G. Embden, G. Schmidt,*** Muskeladenylsäure u. Hefenadenylsäure. Zs. phys. Chem., **181**, 130 (1929). — 29a) ***P. Ostern,*** Muskeladenyl- und Inosinsäure. Bioch. Zs., **254**, 65 (1932). — 30) ***P. A. Levene, E. Jorpes,*** Rate of hydrol. of ribonucleotides. Jl. of biol. Chem., **81**, 575 (1929). — 31) ***E. Annau,*** Struktur einfacher Nukleins. Zs. phys. Chem., **190**, 222 (1930).

des Pankreas. Sie scheint aber hier ebensowenig wie die Ergadenylsäure aus den tierischen Kernsubstanzen zu stammen; auch bei der pflanzlichen Zelle ist dies nicht sicher. LINDNER 32) nimmt dies zwar an, aber KLEIN (l. c. 50) lehnt es ab: wir kommen unten darauf zurück.

Die „**Adenylsäure**", wie man auch — im Gegensatz zum Adenin-nucleotid — die Adenosin-ribose-5-PhS (Ergadenylsäure) kurz nennen kann, interessirt uns hier nur insoweit, als sie ein Substrat für dieselben Enzyme ist, hier und um es gleich vorweg zunehmen, weil wir dort nicht nochmals auf die Chemie der Substrate zurückkommen, für die Purin-aminasen. Inwieweit sich die rein hydrolytischen Enzyme anders verhalten, werden wir § 428 besprechen.

Diese Adenylsäure scheint als solche überall vorzukommen, wenn man tierische Gewebe daraufhin untersucht, was nur zerstreut geschehen ist, im Gegensatz zu ihrem eigentlich biologisch wichtigen Derivat, der Adenyl-pyro-PhS. So sei als Ergänzung zu S. 108 noch erwähnt, daß sie EMBDEN 33) auch in der Niere gefunden hat, POHLE 34) im Herzmuskel; auch die im Blut aufgefundene Adenyls. (HOFFMANN 35), BUELL 36)) wurde als Ergadenyls. identificirt (durch Muskelenzym desaminirbar (37)).

Außer der enzymtypisch wohl selbständigen Adenyl-pyro-PhS (§ 294) kommen noch andere höher phosphorylirte Derivate der Adenylsäure vor, über deren enzymtypische Stellung man noch kein sicheres Urteil fällen kann. DOTZENRODT 38) fand im Skelettmuskel eine Adenosin-di-PhS. Das Herz enthält, wie schon EMBDEN fand, einen höheren Komplex, und seine Annahme, daß es sich um eine Kombination von Adenyl-pyro-PhS mit einer Adenosin-di-PhS handelt, ist gleichzeitig von OSTERN 39) und BEATTIE 40) bestätigt worden, also um eine Di-adenosin-penta-PhS.

Bindung der Phosphorsäure. Im Gegensatz zur Inosinsäure und somit Ergadenylsäure, bei denen die PhS in 5 steht, hat in den Nucleotiden die PhS eine andere Anheftungsstelle am Zucker. Diese war nicht direkt zu bestimmen, da bei der üblichen sauren Hydrolyse diese Ribose-PhS stets zerfällt, während sie bei der Inosinsäure intakt bleibt. Xanthylsäure aber zerfällt in wäss. Lösung bei ihrem eigenen ph = 1,9 von selbst (41), und so konnte LEVENE 42) die freie Ribose-PhS untersuchen; sie hat die PhS in 3. Überführung der Adenylsäure in Hypoxanthylsäure und deren spontaner Zerfall liefert dieselbe Ribose-PhS. Die Ribose-PhS liefert bei der Reduktion eine inaktive Ribitol-PhS, während die synthetisch hergestellte 5-Ribitol-PhS linksdrehend ist (43). Für Cytidylsäure und Uridylsäure führte den Beweis der Anheftungsstelle der PhS in C_3 der Ribose BREDERECK 44) mit Hilfe der Tritylverbindungen.

Die verschiedene Bindung der PhS läßt sich auch durch die Furol-reaktion erkennen. STEUDEL 45) stellte fest, daß Ribodesose an sich kein Furol liefert. Andererseits gibt aber auch die Inosinsäure nur wenig Furol gegenüber den Hefenucleotiden, dieser Unterschied verschwindet bei den Nucleosiden, liegt also nur an der Stellung der PhS im Zucker.

Die einzelnen Nucleotide. Die 4 Einzel-nucleotide aus Phytonucl. sind dank LEVENE

---

32) ***F. Lindner***, Muskeladenylsäure. Zs. phys. Chem., **218**, 12 (1933). — 33) ***G. Embden, H. J. Deuticke.*** Isol. von Muskeladenylsäure aus der Niere. Zs. phys. Chem., **190**, 62 (1930). — 34) ***K. Pohle***, Vork. von Muskeladenylsäure ... im Herzen. ibid., **184**, 261 (1929). — 35) ***W. S. Hoffmann***, Crystall. adenine nucl. from blood. Jl. of Biol. Chem., **63**, 675 (1925). — 36) ***M. V. Buell, M. E. Perkins***, Adenine nucleotide cont. of blood. Jl. of Biol. Chem., **76**, 95 (1927). — 37) ***U. Mroczkiewicz***, Tier. Adeninnucleot. Bioch. Zs., **285**, 267 (1931). — 38) ***H. Dotzenrodt***, Ammoniakbild. Subst. im Brustmuskel. Zs. phys. Chem., **226**, 58 (1934). — 39) ***P. Ostern***, Di-Adenosin-penta-PhS. Bioch. Zs., **270**, 1 (1934). — 40) ***Fl. Beattie, Th. H. Milroy, R. W. M. Strain***, Nucl. compon. of ... cardiac muscle. Biochem. Jl., **28**, 84 (1934). — 41) ***P. A. Levene, A. Dmochowski***, Compar. rates of hydrol. of adenylic etc. acids. Jl. of Biol. Chem., **103**, 563 (1931). S.A. — 42) ***P. A. Levene, St. A. Harris***, Ribosephosph. acid. etc. Jl. of Biol. Chem., **95**, 755 (1932), **101**, 419 (1933). — 43) ***P. A. Levene c. s.***, d-Ribitol-5-phosph. acid. ibid., **105**, 153 (1934). — 44) ***H. Bredereck***, Konstit. der Pyrimidin-nucleotide. Zs. phys. Chem., **224**, 79 (1934). — 45) ***H. Steudel, R. Wohinz***, Struktur einf. Nucleinsäuren. Zs. phys. Chem., **200**, 82 (1931).

und THANNHAUSER (H. W. S. 765) bereits längere Zeit bekannt. Ihre Isolirung ist deshalb relativ einfach, weil diese Nucleinsäure bereits durch schwaches Alkali in die Einzelnucleotide zerfällt. Es genügt 1 % Na OH in der Kälte, (BUELL 46)), oder Soda bei 50—60° (CALVERY 47)); entsprechend einem ph von ca 8,8 (BIELSCHOWSKI, l. c. 12, II). Thymonucl. wird bei gleicher Behandlung nicht angegriffen, und bei der sauren Hydrolyse geht der Zerfall zu weit; ebenso aber auch beim enzymatischen Abbau, wenn Nucleotidase anwesend ist. So konnte erst dann eine Darstellung aller Einzelnucleotide aus Zoo-nucl. gelingen, als man die Enzyme besser kannte und die Nucleotidase auszuschalten gelernt hatte. Dies ist der Schule THANNHAUSER gelungen.

Vorher waren nur mit chemischen Methoden die Pyrimidin-desoxyriboside noch ziemlich mangelhaft bekannt. LEVENE (*l. c. 17*) hatte Di-Phosphorsäure-Ester dargestellt, THANNHAUSER (*l. c. 26*) in sehr schlechter Ausbeute die Desoxyriboside von Cytosin und Thymin. Der Hauptteil und vor Allem die Purin-glykoside waren zerstört. Erst der enzymatische Aufschluß unter sehr milden Bedingungen führte dazu, daß auch diese erhalten blieben; er entspricht der Alkalihydrolyse bei der Phytonucl.

KLEIN und THANNHAUSER 48) gelang es, mit einem Präparat aus Darmschleimhaut, in dem durch Arsenathemmung (49) (s. § 428) die Nucleotidase gehemmt war, zunächst die freie Ribodesose-Guanylsäure zu isoliren. Sie ist sehr labil, da sie bei saurem ph an der Zucker-Base-Bindung zerfällt; nur bei niederer Temp. darstellbar. Später gelang auf demselben Wege die Isolirung auch der Ribodesose-Adenylsäure als Ca-Salz, die freie Säure ist zu zersetzlich (50). Beide Purin-nucleotide sind durch Nucleotidase leicht spaltbar, besonders das des Adenins; sie sind linksdrehend. Weiterhin (51) konnten aus den Hydrolysaten über die Brucinsalze etc. auch die freien Pyrimidin-nucleotide, Ribodesose-Cytidyl-säure und Thymosin-PhS dargestellt werden. Sie sind relativ säurebeständig, rechtsdrehend. — Die für die Strukturfrage der Nucleinsäure wichtigen Di-PhS-Ester LEVENE's (*l. c. 17*) konnten nicht aufgefunden werden; wir kommen auf diese Frage noch zurück.

Die sämtlichen Einzel-nucleotide der Hefennucl. hat mit Hilfe eines Enzyms aus Kaninchendarm MAKINO 52) dargestellt. Indem er in ähnlicher Weise wie KLEIN die Phosphatase hemmte, und zwar durch Phosphat, gelang ihm die Erhaltung der Nucleotide des Guanins, Adenins, Cytosins und Uracils.

Nachdem nun alle Nucleotide einzeln bekannt sind, ist man in der Lage, die beiden Gruppen in ihren chemischen Eigenschaften gegenüberzustellen, was natürlich wesentlich ist für die Eigenschaften der beiden natürlichen Komplexe, der Nucleinsäuren, und damit für deren Struktur. KLEIN 53) stellt folgendes zusammen: Beide Gruppen zeigen große Ähnlichkeiten; Parallelgehen von Löslichkeit und optischer Drehung. Beide Adenin-nucleotide schwer desaminirbar (im Gegensatz zur Ergadenylsäure). Beständig gegen Alkalien, sehr unbeständig gegen Säuren. Es folgt daraus, daß die großen Unterschiede bei den Nucleinsäuren nicht auf den Unterschieden in den einzelnen Baugruppen, sondern auf deren Verknüpfung beruhen müssen. Damit stellt sich KLEIN in Gegensatz zu LEVENE, der die Unterschiede nicht auf die Art der Ver-

---

46) ***M. V. Buell, M. E. Perkins,*** Crist. guanine nucleotide. Jl. of Biol. Chem., **72,** 21 (1927). — 47) ***H. O. Calvery,*** Act. of sodium carb. on yeast nucl. acid. ibid., **72,** 27 (1927). — 48) ***W. Klein, S. J. Thannhauser,*** Ribodesose-Guanylsäure. Zs. phys. Chem., **218,** 173 (1933). S.A. — 49) ***W. Klein,*** Ferm. Depolymer. der tier. Nucleins., ibid., **218,** 164 (1933). S.A. — 50) ***W. Klein, S. J. Thannhauser,*** Ribodesose-Adenylsäure. ibid., **224,** 252 (1934). S.A. — 51) ***W. Klein, S. J. Thannhauser,*** Die Pyrimidinnucleotide aus Thymusnucl. ibid., **231,** 96 (1935). S.A. — 52) ***K. Makino,*** Aufspalt. des Polynucleotids etc. mit Darmenzym. Zs. phys. Chem., **225,** 154 (1934). — 53) ***W. Klein, A. Rossi,*** Aufbau des Polynucleotid-molek. Zs. phys. Chem., **231,** 104 (1935). S.A.

knüpfung an sich, sondern nur auf die Verschiedenheit der Zucker, resp. die Bindungsstelle der zweiten Phosphorsäure-gruppe in den beiden Polynucleotiden zurückführt; darauf muß nun näher eingegangen werden.

Polynucleotide. Hier sind zu unterscheiden die echten Nucleinsäuren und einige noch höhere Komplexe. Die **echten Nucleinsäuren** sind dadurch charakterisirt, daß sie 4 Nucleotide enthalten, also **Tetranucleotide** sind. Von diesen scheint es bisher nur zwei überhaupt zu geben. Die sog. Hefennucleinsäure, besser — aber auch nicht vollkommen, da sie auch im Tierkörper vorkommt — **Phytonucleinsäure** genannt, ist charakterisirt durch den Aufbau aus 4 Ribose-nucleotiden des Adenins, Guanins, Cytosins und Uracils. Alle anderweitig als in der Hefe gefundenen sind sehr wahrscheinlich damit identisch, so die des Weizenkorns (Calvery **54)**) (Tritico-nucleinsäure) und die aus Timothee-bacillen (*Mycobacterium phlei Moeller*) (Coghill **55)**).

Ebenso scheint es nur eine echte **Zoonucleinsäure** zu geben, charakterisirt durch die vier Ribodesose-Nucleotide des Adenins, Guanins, Cytosins und Thymins. Nach der Nuclealfärbung (l. c. 8) gemessen kommt aber Thymon. auch in Pflanzen vor, so in Weizenkeimen (Feulgen **55a)**), ferner in den Kernen von Trypanosomen und Bakterien (Feulgen **56)**, Voit **57)**) und echten Hefen (**57a)**). Über die Nucl. der Tuberkelbacillen s. u.

Andererseits ist es ganz sicher, daß zum mindesten eine Guanylsäure mit Ribose in weiterer Bindung an eine komplette Ribonucleinsäure in tierischen Zellen vorkommt. Zwar ist Steudel **58)** im Recht, wenn er eine der Nucleinsäuren aus Pankreas (wie schon früher Levene) als völlig identisch mit der Thymonucleinsäure betrachtet; aber daneben kommt eben zusammen mit der Riboguanylsäure noch eine zweite Ribonucleinsäure vor, und zwar nicht nur im Pankreas, sondern nach Jones und Perkins **59)** auch in Leber und Milz, nach Calvery **60)** in Hühnerembryonen. Auf ihre feinere Struktur kommen wir unten zurück. Die Bezeichnungen Zoo- und Phytonucleinsäure sind also nicht uneingeschränkt geltend, so daß Levene sie ohne jede Vorwegnahme ihres Vorkommens lieber als Ribo- und Ribodesoxy-nucleinsäure bezeichnen möchte.

Diese β-Pankreasnucleinsäure soll nun wieder nicht dem Chromatin der Zellkerne entstammen, wie Lindner (l. c. 32) annimmt, sondern dem sekretorischen Gewebe, da sie bei Degeneration des Parenchyms nach Gangunterbindung verschwindet (E. Hammarsten **60a)**). Und damit erhebt sich die sehr wichtige Frage, ob man nicht überhaupt die beiden Nucleins. ganz anders einteilen müßte, nämlich ohne Rücksicht auf tierische oder pflanzliche Herkunft in Chromatinnucleinsäure und nicht dem Kern entstammende Cytoplasma-nucl. Feulgen c.s. sind sehr geneigt, nach ihren Befunden mit der Nuclealreaktion überall die Thymonucl. = Chromatinnucl. zu setzen; dagegen soll die Tritico-nucl. dem Cytoplasma entstammen.

---

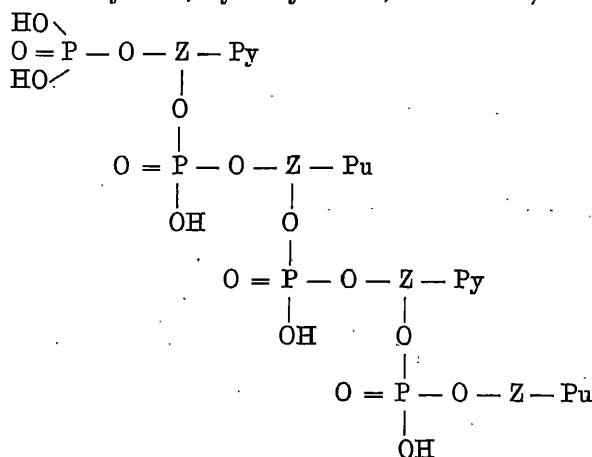
54) ***H. O. Calvery, D. B. Remsen,*** Nucleotids of triticonucl. acid. Jl. of Biol. Chem., **78,** 593 (1927). — 55) ***R. D. Coghill,*** Nucl. acid of thimothy bac. Jl. of Biol. Chem., **90,** 57 (1931). — 55a) ***R. Feulgen c. s.,*** Mikroch. Nachw. einer ... Thymonucleins. etc. Zs. phys. Chem., **135,** 203, 249 (1924). — 56) ***F. Feulgen-Brauns,*** Nuclealfärb. Arch. Phys. (Pflüger), **203,** 415 (1924). — 57) ***K. Voit,*** Verh. der Bakt. zur Nuclealfärb. Zs. exp. Med., **47,** 183 (1925). — 57a) ***E. Rochlin,*** Nuclealreakt. bei Hefen. Cbl. Bact. (II), **88,** 304 (1933). — 58) ***H. Steudel,*** Nucleins. der Pankreasdrüse. Zs. phys. Chem., **231,** 273 (1935). — 59) ***W. Jones, M. S. Perkins,*** Occ. of plant nucl. in animal tissue. Jl. of Biol. Chem., **62,** 291 (1925). — 60) ***H. O. Calvery,*** Isol. of four pentose nucleotides from chicken embryos. ibid., **77,** 489 (1928). — 60a) ***E. Hammarsten c. s.,*** Gehalt an Pentose im Hundepankreas etc. Act. Med. Scand., **68,** 215 (1928); BPh **46,** 675.

Die Strukturlehre der beiden echten Nucleinsäuren kann also davon ausgehen, daß jede von ihnen je vier genau bekannte Nucleotide enthält, und zwar zu gleichen Teilen, nämlich je eins. Die echten Nucleinsäuren sind also **Tetranucleotide.** Die Baugruppen stehen somit fest; das Problem ist, ihre Verknüpfung zu finden, und zwar speciell die Bindungen der Phosphorsäurereste, um die noch in dem kompletten Molekül vorhandenen sauren Gruppen gegenüber den 8 in den freien Nucleotiden (4 einmal abgebundene PhS-en) richtig anzuordnen.

Daß eine PhS an je einem Zucker haftet, ist also der Ausgangspunkt; weitere Anheftungsstellen können wieder an einen anderen Zucker oder an eine andere Base sein; ganz geklärt ist die feinere Struktur noch nicht; wir wollen so vorgehen, daß wir erst die hier autoritative Schilderung von LEVENE (l. c. 1, S. 262 ff.) bis 1931 zu grunde legen und dann neuere Arbeiten zu dem Thema betrachten. Die beiden Säuren haben ungefähr den gleichen Bauplan, im Gegensatz zu früheren Ansichten; ihre vielen sichtbaren Unterschiede sind auf die große Labilität der Ribodesose und eine andere Bindungsstelle der zweiten PhS zurückzuführen; andererseits ist die Annahme LEVENE's, daß sie genau denselben Bauplan haben, nicht unbestritten.

Thymonucleinsäure (Ribodesose-nucleinsäure). Unter Berücksichtigung aller chemischen und physikochemischen Ergebnisse, besonders auch der Hydrolysen-Konstanten (LEVENE u. JORPES **61**)), und des Entstehens der Thyminsäure (durch die leichte Abspaltung ausschließlich der Purine), die also 2 Diphospho-pyrimidin-nucleotide enthält, kommt LEVENE zu folgender Formel:

(Z = Desoxyribose, Py = Pyrimidin, Pu = Purin)

```
HO\
O = P — O — Z — Py
HO/         |
            O
            |
     O = P — O — Z — Pu
         |       |
         OH      O
                 |
          O = P — O — Z — Py
              |       |
              OH      O
                      |
               O = P — O — Z — Pu
                   |
                   OH
```

I. Thymonucleinsäure nach LEVENE.

Die Wahl der Reihenfolge ist nicht willkürlich. LEVENE führt aus, daß weder 2 Pyrimidine noch 2 Purine die Innenpositionen haben können, daß vielmehr das Alterniren statthaben muß. Willkürlich ist nur die Auswahl, welches Pyrimidin oder Purin an der betr. Stelle steht; nur so ist es zu verstehen, wenn LEVENE (l. c. 1, S. 268) die Reihenfolge: Thymin — Adenin — Cytosin — Guanin schreibt. Allerdings beruht seine Argumentation z.T. auf der Entstehung der soeben erwähnten beiden Diphospho-pyrimidin-nucleotide (Abspaltung des Purins, Aufteilung in der Mitte), die aber KLEIN (l. c. 51) nicht finden konnte.

Hefennucleinsäure. Deren Struktur ist viel mehr umkämpft worden als die der Thymonucl. Die Struktur der letzteren aufzuklären, galt als hoffnungslos, so lange man den Zucker nicht erkannt hatte, und dann ging es sehr schnell, da inzwischen die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse den allgemeinen Aufbau aus 4 Nucleotiden zu gleichen Anteilen gesichert hatten. Bei der Phytonucl. war dieser Kernpunkt insofern lange umstritten, als man ihr einen Aufbau aus nur 3 Nucleotiden zuschrieb, und das Uridin, resp. die Uridyl-PhS als secundäres Produkt der Umwandlung von Cytosin ansah. Nachdem dann LEVENE auch hier die Präexistenz

61) ***P. A. Levene, E. Jorpes,*** Rate of hydrolysis of ribonucleotides. Jl. of Biol. Chem., **81,** 575 (1929).

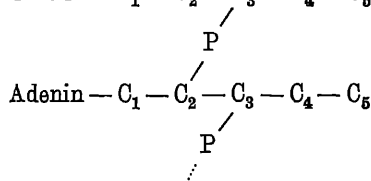
der 4 Nucleotide gesichert (62) und CALVERY und JONES 63) ihren Einspruch zurückgezogen hatten, war das Feld bereinigt. Die Phytonucl. ist nach LEVENE ebenfalls ein Tetranucleotid, was ELLINGHAUS 64) aus kalorischen Messungen der Säure selbst und ihrer Komponenten bestätigt hat. LEVENE (l. c. 1, S. 274) gibt ihr demzufolge genau dieselbe Struktur wie der Thymonucl. in der Reihenfolge der Basen: Uracil — Adenin — Cytosin — Guanin, wobei wieder nur die Stellung der Purine resp. Pyrimidine untereinander auswechselbar ist.

Die Unterschiede im Verhalten der beiden Nucleinsäuren, insbesondere die Instabilität der Ribose-nucl. gegen schwaches Alkali, führt LEVENE 65) auf die Zucker zurück, und zwar nicht nur auf deren Verschiedenheit an sich, sondern auch auf ihre Verknüpfungsstelle mit Phosphorsäure in den Nucleinsäuren selbst, nämlich die Verschiedenheit der zweiten PhS-Bindung. Die freien Nucleotide haben die PhS jedenfalls an C_3 bei beiden Typen. Bei der Ribonucl. sitzt die zweite PhS (welche die Verbindung herstellt) an C_2, welche Haftstelle stets zur Instabilität führt. Hier bedeutet also die Instabilität der Bindung in C_2, daß der Zerfall in freie Nucleotide leicht, schon durch schwaches Alkali eintritt. In der Ribosedesoxy-nucl. sitzt die zweite PhS an C_5; dort sitzt sie so fest, daß beim enzymatischen Zerfall auch diese PhS hängen bleibt und somit die Pyrimidin-di-PhS'en entstehen, die wir mehrfach erwähnt haben, und die KLEIN (l. c. 51) nicht finden kann (s. u.).

Schema der Ribonucleinsäure: Uracil $-C_1-C_2-C_3-C_4-C_5$ (P = Phosphorsäure)

P

Adenin $-C_1-C_2-C_3-C_4-C_5$

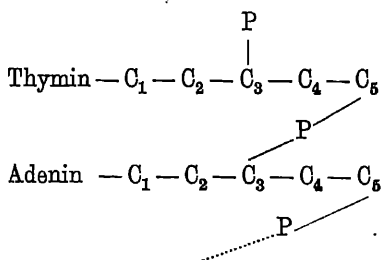
P

Schema der Thymonucleinsäure:

P

Thymin $-C_1-C_2-C_3-C_4-C_5$

P

Adenin $-C_1-C_2-C_3-C_4-C_5$

P

Diese unitarische Auffassung LEVENE's hat mehrfach Bedenken erregt, wie seine Formulirung überhaupt, und vor Allem ist KLEIN (l. c. 53) in einer eingehenden Kritik dagegen aufgetreten; eine endgiltige Strukturformel aufzustellen, hält er für verfrüht.

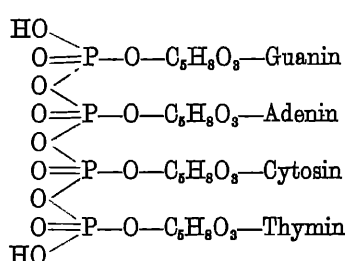
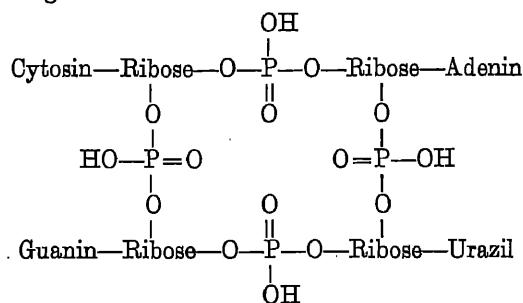
Die Auslegung LEVENE's, daß beide echten Nucleinsäuren denselben Bau haben, womit alle Wesensunterschiede auf die Bindungen an den Zuckern abgeschoben werden, lehnt KLEIN ab. Die Verschiedenheit der Zucker allein kann das ganz verschiedene Verhalten gegen hydrolytische Agentien nicht erklären. Er verweist auf die bekannte Tatsache, daß Phytonucl. schon durch verd. NaOH bei Zimmertemp. zerfällt, Zoonucl. dabei nicht angegriffen wird. Auch die enzymatische Hydrolyse durch gereinigtes Darmferment (§ 426) zeigt in bezug auf Geschwindigkeit und Arsenathemmung erhebliche Differenzen. Derartige Unterschiede in der Resistenz gegen Zerfall sprechen bei so wesensähnlichen Baugruppen für eine verschiedenartige Verknüpfung dieser Baugruppen.

---

62) ***P. A. Levene,*** Nitrogen. comp. of yeast nucl. acid. Jl. of Biol. Chem., **67,** 325 (1926). — 63) ***H. O. Calvery, W. Jones,*** Nitrog. groups of nucleic acid. ibid., **73,** 73 (1927). — 64) ***J. Ellinghaus,*** Calorim. Unt. an Nucleinsäuren. Zs. phys. Chem., **164,** 308 (1927). — 65) ***P. A. Levene, R. St. Tipson,*** Ring structure of thymidin. Jl. of. Biol. Chem., **109,** 623 (1935).

KLEIN erhebt aber aus enzymtypischen Erwägungen heraus ernstliche Bedenken gegen die Esterformel LEVENE's für die Zoonucl. an sich. Seine Argumentation ist etwa die folgende: wenn die LEVENE'sche Formel richtig ist, so sind sämtliche Bindungen zwischen den Nucleotiden ebenso Phosphorsäure-Ester-Bindungen wie in den Nucleotiden. Nun löst aber das erste der Stufenenzyme, die Thymo-nucleinase (§ 426) tatsächlich diese Bindungen und nur diese PhS-Bindungen zwischen den Nucleotiden; denn die andere vorgestellte Wirkung, die primäre Abspaltung der beiden Purinbasen und Zurückbleiben von Di-phosphorsäure-estern, die LEVENE (*l. c. 17*) und auch THANNHAUSER (*l. c. 26*) angenommen hatten, existirt anscheinend nicht. Die primäre Wirkung des ersten Fermentes müßte also nach der Formel von LEVENE ebenfalls eine Phosphatase-wirkung sein, das erste Ferment also eine Phosphatase. Dann ist aber — nach KLEIN — unverständlich, warum erstens diese Phosphatase tatsächlich nur die Zwischenbindungen löst, nicht aber die Nucleotidbindung selbst; dies besorgt ein anderes Ferment, identisch mit der üblichen „Phosphatase" (Phosphoesterase); und zweitens, warum eben diese erste „Phosphatase" indifferent gegen Arsenate ist, welche die zweite „Phosphatase" praktisch völlig ausschalten. Das Gegenargument, daß ja in der LEVENE'schen Formel die PhS in den Zuckern an zwei verschiedenen C steht, schlägt nicht durch, denn Darmnucleotidase zerlegt beide Adenosin-PhSen (Syn- und Ergadenylsäure) mit der PhS in C_3 und C_5 mit gleicher Geschwindigkeit. Die Bindung zweier PhS an einen Zucker würde sich rein chemisch nur durch die Darstellung der mehrfach erwähnten Di-Phosphate (*l. c. 17, 26*) erweisen lassen; aber deren Auftreten ist eben nicht sicherzustellen.

THANNHAUSER 66) hat aus diesen Erwägungen für Zoo-nucl. eine anhydrische Formel II vorgeschlagen; dagegen spricht rein chemisch bisher nur die Bestimmung der Titrationskurven nach LEVENE 67), denen KLEIN wegen der großen Schwierigkeit, völlig reine Zoonucl. darzustellen, keine allein entscheidende Bedeutung zumessen möchte.

HO
O=P—O—$C_5H_8O_3$—Guanin
O
O=P—O—$C_5H_8O_3$—Adenin
O
O=P—O—$C_5H_8O_3$—Cytosin
O
O=P—O—$C_5H_8O_3$—Thymin
HO

II. Thymonucleinsäure nach THANNHAUSER.

III. Hefenucleinsäure nach TAKAHASHI.

MAKINO 68) hält ebenfalls die Bestimmung der Säuregruppen durch elektrom. Titration nach LEVENE für nicht sicher. Er versucht an stelle dessen, die Säuregruppen indirekt festzulegen durch Ermittelung des Alkaliverbrauchs vor und nach der totalen Zerlegung (durch Alkali resp. Enzym). Er findet einen Zuwachs von 4 Säuregruppen; da die 4 Nucleotide 8 enthalten müssen, sollte die genuine Nucleinsäure auch 4 enthalten, anstatt 5 nach LEVENE. So gelangt auch MAKINO zu der Ringformel III nach TAKAHASHI 69) (s. u.); und zwar auch für Thymonucl., nur ist hier eben die Bindung von C_3 nach C_5, nicht nach C_2.

Sehr wichtig wird hier dagegen die enzymtypische Betrachtung. Denn ein Gebilde wie II müßte von einer Pyrophosphatase zerlegt werden, und zwar einer, die der LOHMANN'schen Adenyl-pyrophosphatase zum mindesten sehr nahesteht. Diese ist aber enzymtypisch völlig verschieden von der gewöhnlichen Phospho-Esterase. Grade einer der entscheidenden Punkte, ob nämlich dieses Enzym ebenfalls (wie die also als Pyrophosphatase anzusprechende) „Thymonucleinase" arsenfest ist, müßte erst geprüft werden.

66) ***S. J. Thannhauser,*** Stoffwechselprobleme. Berlin 1934; cit. n. 58). — 67) ***P. A. Levene, H. S. Simms,*** Nucleic acid structure etc. Jl. of Biol. Chem., **70,** 327 (1926). — 68) ***K. Makino,*** Konst. der Nucleinsäuren. Zs. phys. Chem., **232,** 229, **236,** 201 (1935). S.A. — 69) ***H. Takahashi,*** Ferm. Dephosphor. der Nucleinsäure. Jl. of Biochem., **16,** 463 (1932). S.A.

Die Sache hat aber enzymtypisch betrachtet noch eine ganz andere Seite. KLEIN betrachtet als sein Hauptargument, daß Phosphatase Phosphatase sein müßte, gleichgiltig an welchem C der Zucker die PhS gebunden ist. Darauf kommt es aber nicht an; entscheidend ist vielmehr die Frage, ob für solche Gebilde, bei denen die PhS zweifach verestert ist, besondere Enzyme, Phospho-di-esterasen, in Frage kommen. Dies ist von der Schule AKAMATSU in einer Reihe von Arbeiten behauptet worden, die wir in den §§ 283, 284 eingehend besprochen haben. TAKAHASHI 69) hat daraufhin sogar eine besondere Formel für Hefennucl. (III) aufgestellt in der Absicht zu beweisen, daß in diesem Gebilde der erste Angriff nur durch eine Phospho-di-esterase erfolgen könne, ohne daß zunächst PhS frei wird, d. h. bis zum Nucleotidstadium; erst dann greift die „Mono-Esterase", d. h. hier die Nucleotidase an. Nach meiner Meinung ist aber auch die LEVENE'sche Formel mit dieser Grundannahme durchaus verträglich; auf die eine einzige freie OH-Gruppe käme es hier für die Wirkung einer Di-Esterase nicht an; sie könnte genau so gut wie in der Formel III auf die inneren O-Brücken wirken und die Einzel-nucleotide in Freiheit setzen, ohne daß PhS frei wurde; hat doch auch das Diphenylphosphat, das Hauptsubstrat der „Phospho-diesterase", eine freie OH-Gruppe. Nur mit Formel II, der Pyrophosphatbindung, wäre dies nicht verträglich, da nach den japanischen Forschern die „Pyrophosphatase" von der „Diesterase" verschieden ist.

KLEIN erkennt nun die Argumentation TAKAHASHI's an sich an, unter der Voraussetzung, daß die Verhältnisse tatsächlich so liegen, wie es die Schule AKAMATSU angibt. Das aber ist eben die Hauptfrage. CONTARDI c. s. 70) haben zwar den Angriff der Hefennucl. durch eine „Di-Esterase" an sich bestätigt, finden aber sonst allerlei Abweichungen in den speciellen Angaben, nämlich im Hinblick auf die „Cholin-phosphatase" (S. 104), die wieder etwas anderes sein soll. Es lag nämlich der Gedanke nahe, daß diese Cholinphosphatase dasselbe ist wie die „Di-Esterase". Reiskleie-enzym spaltet aber Nucleinsäure auch dann, wenn die Cholinphosphatase präparativ entfernt ist. Die erste Phase wird durch die Phospho-diesterase katalysirt, Opt. ph = 4, ohne Auftreten freier anorg. PhS. Die zweite Phase, opt. ph = 5,5, bewirkt durch die Mono-esterase, setzt die gesamte PhS frei. Gift von *Daboia* setzt nur organische PhS frei, Gift von *Lachesis* und die Enzyme von Schimmelpilzen und Bakterien spalten total auf.

Das was also CONTARDI c. s. bestätigen, ist nur die Tatsache, daß es Enzymsysteme gibt, die mehr minder ausschließlich die Nucleinsäure soweit spalten, daß noch keine anorg. PhS freigesetzt wird. Das ist aber selbstverständlich, wenn man überhaupt mit Polynucleotidasen im Gegensatz zu Nucleotidasen rechnet, und muß dann in jedem Falle zu beobachten sein, unbeschadet irgend einer feineren Struktur der Polynucleotide; für diese sagt diese enzymatische Reaktion garnichts aus. Dazu müßte vorher bewiesen werden, daß die fragliche Polynucleotidase wirklich eine streng specifische „Di-Esterase" ist, und daran fehlt es. Denn KLEIN konnte die Angaben der Schule AKAMATSU überhaupt nicht reproduciren. Das „*Habu*"-Enzym (S. 103) enthielt nicht bloß die „Di-Esterase", sondern spaltet auch PhS ab und zerlegt mit gleicher Geschwindigkeit sowohl Phenyl-phosphat wie Diphenylphosphat. Ebenso wenig gelang in Extrakten aus Schweinenieren eine präparative Trennung. Darmferment spaltet gleich schnell die beiden Phenylphosphate, aber viel langsamer als alle natürlichen Substrate und wird dabei sehr auffallenderweise durch Arsenat nur wenig gehemmt, während die Enzymwirkung auf natürliche Nucleotide fast ganz aufgehoben wird. Das sieht nun wieder so aus, als ob es eine „eigene" „Phenyl-phosphatase" gäbe in dem Sinne wie dies immer gilt, d. h. im Sinne einer Verschiebung der relativen Specifitäten, die in einem anderen Fall umgekehrt zu laufen scheint, wenn Niere Phenylphosphat nach WALDSCHMIDT-LEITZ 72) schneller spaltet als Erg-adenylsäure. Mit der Verschiebung der relativen Specifitäten durch Änderungen im Enzymsystem können dann natürlich wie stets auch Änderungen in der Wirkung von hemmenden Giften eintreten, hier also der Arsenwirkung.

---

70) ***C. A. Contardi, C. Ravazzoni,*** Sciss. enzym. de l'acide nucl. etc. Arch. Ital. Biol., **92**, 64 (1935). S.A. — 71) ***C. A. Contardi, C. Ravazzoni,*** Sciss. enzim. dell' acido nucl. etc. Ist. Lomb. Rendic. (II), **67**, 503 (1934), **68**, 726 (1935). S.A. — 72) ***E. Waldschmidt-Leitz, F. Köhler,*** Spez. der Nierenphosphatase. Bioch. Zs., **258**, 360 (1933). S.A.

So lange die Verhältnisse bei den Phosphatasen noch so widerspruchsvoll sind, kann man diese enzymtypischen Prüfungen noch nicht für die Aufstellung einer bestimmten Formel für die beiden Nucleinsäuren ausnutzen. Auch KLEIN läßt die Frage vorläufig offen; auch für die Unterschiede zwischen Phyto- und Zoonucleinsäure haben wir noch keine sichere Deutung.

Sonstige Polynucleotide. Unter diesem vorläufigen Titel seien einige noch nicht völlig klargestellte Stoffe untergebracht. Einerseits steht zur Diskussion, welcher Art die Nucleinsubstanzen der Bakterien sind, andererseits die Stoffe des Tierkörpers, die Ribonucleotide enthalten, also den Phytonucleinsäure nahestehen.

Die Nucleinsäure der **Tuberkelbacillen** (Tuberculinsäure) wird seit RUPPEL (1898) den Zoonucl. zugerechnet, weil sie Thymin enthalten soll; aber klargestellt ist die Sache heute noch nicht. JOHNSON c. s. 73) fanden ebenfalls Cytosin und Thymin, aber später 5-Methylcytosin, aber nicht genügend identificirt. Das KH ist noch nicht genauer untersucht, ebensowenig die Enzymspaltung. Auch andere bakterielle Nucl. sollen Zoonucl. sein, da sie die „Nucleal-reaktion" geben (FEULGEN, VOIT, l. c. 56, 57). Das Vorkommen von 5-Methyl-cytosin ist insofern interessant, als es nach HAHN 74) durch Hefenextrakt zu Thymin desaminirt wird. Es könnte also event. phylogenetisch als Vorstufe des Thymins in den Nucleinsäuren der Tiere angesehen werden.

Wichtiger ist die Frage nach dem Vorkommen von Ribonucleotiden in tierischen Geweben, die sich um die Natur der Nucleinsäuren resp. Nucleotide des Pankreas herum bewegt. Wir konnten als Resultat dieser Arbeiten im H.W. S. 765 berichten, daß im Pankreas einerseits echte Zoonucl. vorkommt, und andererseits Guanylsäure; und daß ein höherer Komplex oder Symplex, ein **„Pentanucleotid"**, vorhanden ist. Fraglich blieb aber, ob in diesem Komplex selbst echte Zoonucl. vorkommt, wie FEULGEN (*l. c. 13*) annahm, oder nach HAMMARSTEN (*l. c. 14*) ein anderes Polynucleotid.

JORPES **75)** zeigte dann, daß sozusagen beides in Betracht kommt; daß einerseits im Pankreas eine echte Zoonucl. vorkommt (höchstens zu $^1/_3$), andererseits eine Phytonucleinsäure mit Ribose, aber kein gemischter Typus nach FEULGEN. Das generelle Vorkommen von Ribonucleinsäure selbst, erkennbar an ihren Spaltprodukten, ist bereits von JONES u. PERKINS (l. c. 59) gesichert worden, jedoch ist die einheitliche komplexe Natur des „β-Nucleoproteids" aus Pankreas erst von JORPES festgelegt worden. Es handelt sich zweifellos um höhere Polynucleotide, indessen hat auch eine spätere Untersuchung **(76)** noch nicht sicher entscheiden können, ob es sich um ein Penta- oder ein Hexanucleotid handelt, oder ein Gemisch von beiden. Jedenfalls ist es, wie JORPES **77)** besonders untersucht hat, kein Gemisch von gewöhnlicher Ribonucl. mit einem Mol. Guanylsäure, sondern ein höheres Polynucleotid, und zwar nach den genaueren Analysen mit Hilfe einer besonderen Methode **(77a)** ein Pentanucleotid mit 1 Adenin + 2 Guanin. Die Einheitlichkeit des Polynucleotids konnte durch Bestimmung der freien Diffusion bestätigt werden **(77b)**; diese führt zu einem Molg. von 3000, was für ein Molekül aus 10 Nucleotiden stimmen würde; jedoch kann diese Verdoppelung auch durch einen gesteigerten Salzeffekt vorgetäuscht werden. Daneben enthält also das Pankreas, und zwar im Chromatin, die ganz normale Zoonucl. (STEUDEL, l. c. 58), die man erhalten kann, wenn man erst durch einfache Wasserextraktion das „β-Nucleoproteid" herauszieht und dann mit alkalischem Aufschluß die Zoonucl. gewinnt.

---

73) ***Tr. B. Johnson c. s.***, Researches on pyrimidines. Jl. Amer. Chem. Soc., **45**, 1828 (1923), **47**, 2838 (1925). — 74) ***A. Hahn, W. Haarmann***, Einw. von Hefeextr. auf Aminopyrimidine. Zs. Biol., **85**, 275 (1926). — 75) ***E. Jorpes***, Pankreasnucleinsäuren. Acta Med. Skand., **68**, 503 (1928); ausführl. in einer Monographie: „Über Pentosenucleinsäuren", Stockholm 1928. S.A. — 76) ***P. A. Levene, E. Jorpes***, Separ. of ribonucl. from thymonucl. acid. Jl. of Biol. Chem., **86**, 389 (1930). S.A. — 77) ***E. Jorpes***, On the pentose polynucleotides of the pancreas. Biochem. Jl., **28**, 2102 (1934). S.A. — 77a) ***E. Jorpes***, Quantit. determ. of adenine in the pres. of guanine. Biochem. Jl., **28**, 2097 (1934). S.A. — 77b) ***K. Myrbäck, E. Jorpes***, Freie Diffusion von Nucleinsäuren etc. Zs. phys. Chem., **237**, 159 (1935). S.A.

II. Das Enzymsystem Nuclease.

1) Systematik und Eigenschaften der Enzyme.

§ 428. Entsprechend dem Aufbau der Nucleinsäuren gliedert sich nun das Fermentsystem in drei Gruppen, von denen jede eine der Stufen des Abbaus katalysirt, und die wir nach LEVENE bereits im H. W. der Darstellung zu grunde legen konnten. **Nucleasen** als der historische Name bleibt der Obertitel der ganzen Gruppe. Die 3 Untergruppen sind dann:

I. Zerlegung der nativen Nucleinsäuren in Nucleotide: **Polynucleotidasen** oder Nucleinasen.
II. Zerlegung der Nucleotide in Nucleoside + Phosphorsäure: **Nucleotidasen.**
III. Zerlegung der Nucleoside in Base + Zucker: **Nucleosidasen.**

Auch die Gruppenzugehörigkeit der Enzyme ist ziemlich klar. Die Zusammenfassung der drei Gruppen unter dem gemeinsamen Namen ist innerlich nicht berechtigt; nur deswegen recht zweckmäßig, weil nur sie eine gemeinsame Behandlung der Abbaufragen der eigenartigen Substrate und der physiologischen Bedeutung der Hauptgruppe ermöglicht. Rein systematisch gehören die Enzyme ganz verschiedenen Gruppen an. Die Nucleosidasen sind Glykosidasen, und zwar anscheinend — oder besser nach unseren bisherigen Kenntnissen — die einzigen bekannten Pentosidasen; anscheinend sind sie sogar für die Riboside und Ribodesoside streng specifisch, jedoch liegen darüber abschließende Untersuchungen noch nicht vor. Die beiden anderen sind systematisch in jedem Falle Phosphatasen; die Nucleotidasen gehören ohne Weiteres zu den gewöhnlichen Phospho-Esterasen; ob sie überhaupt eine ausgeprägte oder nur eine geringfügige relative Spezifität haben, ist noch nicht klar zu übersehen. Die Polynucleotidasen lassen sich noch nicht sicher unterbringen: entweder gehören sie zu den „Pyrophosphatasen" oder zu einer anderen Sondergruppe der Phosphatasen, den in ihrer Abgrenzung noch zweifelhaften „Di-Esterasen", welche die sekundär, dh. an 2 OH-Gruppen substituirten PhS-Ester spalten.

Polynucleotidasen (Nucleinacidasen). Die nähere Erforschung dieser Enzymgruppe an sich befindet sich noch im allerersten Anfang. Noch in dem 1931 erschienenen Buch von LEVENE (l. c. 1) wird eigentlich nur die Tatsache bestätigt, daß ein solches Enzym anzunehmen nötig ist, und daß man diesem Enzym, das sich besonders deutlich in Extrakten aus Darmschleimhaut erkennen läßt, die Zerlegung des Polynucleotids in die einzelnen Nucleotide zuzuschreiben hat, wie zuerst THANNHAUSER und BLANCO 78) und dann LEVENE und DILLON 79) betont haben. Die endgiltige Sicherstellung des Enzyms ist dann LEVENE u. DILLON 80), sowie KLEIN 81) gelungen. Ob für die beiden Nucleinsäuren zwei verschiedene specifische Enzyme vorhanden sind, so daß KLEIN's 81) Bezeichnung „Thymonucleinase" auch eine sachliche Differenzirung bedeutet, ist noch nicht sicherzustellen. Grade die KLEIN'sche Formulirung mit Pyrophosphat-bindungen macht es eigentlich ziemlich unwahrscheinlich. Tatsächlich hat KLEIN eine andere Auffassung. Er glaubt nämlich, daß bei alkalischer Reaktion überhaupt nur ein Ferment wirkt, eben die „Thymonucleinase", während LEVENE an

---

78) ***S. J. Thannhauser*, *G. Blanco*,** Einw. des Duodenalsaftes auf Thymonucl. Zs. phys. Chem., **161**, 126 (1926). — 79) ***P. A. Levene*, *R. T. Dillon*,** Intestinal nucleotidase. Jl. of Biol. Chem., **88**, 753 (1930). — 80) ***Dies.*,** dass. ibid., **96**, 461 (1932). — 81) ***W. Klein*,** Ferm. Depolymer. der tier. Nucleinsäure. Zs. phys. Chem., **218**, 164 (1933). S.A.

zwei verschiedene Enzyme glaubt, wie dies nach seiner Formel tatsächlich wahrscheinlicher ist. Nach KLEIN soll aber Thymonucleinase die Phytonucl. garnicht angreifen, und diese beim opt. ph. des Enzyms (8,7, s. u.) schon von selbst zerfallen. Es ist nun durchaus möglich, daß die irgendwie specifische „Phosphatase" bei alkalischer Reaktion bei der Hefennucl. garkeine Gelegenheit mehr hat, katalytisch einzugreifen. Aber damit ist das Problem noch in keiner Weise geklärt, denn Hefennucl. wird ja auch von sauren Phosphatasen angegriffen, z.B. von der aus Reiskleie bei ph = 4 (CONTARDI, l. c. 70), sowie durch Enzyme aus Schimmelpilzen (s. u.). Eine Spaltung von Hefennucl. durch Gesamtferment „Nuclease" aus Rinderniere bei ph = 8,2 beschreibt MAKINO **82)**, der trotz der bekannten Spaltbarkeit durch Alkali allein an eine enzymatische Aufspaltung glaubt. Ob hier nun wieder eine ganz andere Phosphatase vorliegt, die vielleicht nur Hefennucl. angreift, ist nicht zu ersehen. Die Frage, ob grundsätzlich für die beiden Nucl. verschiedene specifische Fermente vorhanden sind, muß also gesondert neu geprüft werden; vor Allem an der Wirkung „saurer" Phosphatasen.

Eine etwas nähere Untersuchung liegt von LEVENE u. DILLON **80)** vor. Sie benutzten dasselbe Präparat aus Darm, das sie als Nucleotidase verwenden (s. u.). Dialyse entfernt einen Hemmungskörper und reichert die Polynucleotidase etwas gegenüber der Nucleotidase an. Adsorption möglich, aber bisher keine Elution. — Der wichtigste Fortschritt liegt in der Ausschaltung der gleichzeitig vorhandenen Nucleotidase durch KLEIN **81)**, so daß das Enzym in reiner Wirkung studirt werden konnte. Es tritt praktisch kein anorgan. P auf (einige Prozente): die Wirkung ist also ausschließlich die Freilegung der Nucleotide.

In bezug auf die systematische Stellung des Enzyms ist noch zu bemerken, daß KLEIN von einem „depolymerisirenden" Enzym spricht. Dieser Ausdruck ist zu beanstanden: er erinnert an die „desaggregirenden" Enzyme der Polyosen, die sehr wahrscheinlich nicht existiren. Die Polynucleotidase ist aber eine ganz normale Hydrolase; sie löst in jedem Falle Sauerstoffbindungen unter Eintritt von Wasser; in Frage steht nur, ob sie eine wahre „Esterase" ist, d. h. Phosphorsäure von einem Zucker ablöst, oder eine „Pyrophosphatase", die eine Anhydridbindung zwischen 2 Phosphorsäuren löst (§ 427).

ph-Optimum ca. 8,5. **Einheit:** Enzymmenge, die in 6 h aus 1 ccm 0,0093 m. Thymonucl. mit 1,14 mg P 50 % = 0,57 mg P frei macht (30°, ph = 8,6) (LEVENE **80)**). **NaF** hemmt viel stärker als Nucleotidase.

Vorkommen stets mit den anderen Stufenfermenten zusammen. Eine Quelle für dies Enzym ohne gleichzeitiges Vorhandensein von Nucleotidasen und Nucleosidasen glaubt MAKINO **82a)** im käuflichen Trypsin-MERCK gefunden zu haben.

Nucleotidasen. Diese Enzymgruppe ist schon viel länger bekannt und bereits im H. W. relativ eingehend erörtert. Aber auch ihre exaktere Bearbeitung ist erst in neuester Zeit unternommen worden, und zwar am tierischen Enzym. In allen seinen äußeren Eigenschaften entspricht es vollständig der „alkalischen" Phosphatase der Tiergewebe und ist in bezug darauf bereits §§ 288 ff. mit behandelt worden; die „sauren" Parallelenzyme, z.B. der Pflanzen, sind noch nicht genauer bekannt. Die Gleichsetzung der „Nucleasen" mit den Zuckerphosphatasen ist m. W. zuerst an der stets gleichgerichteten Wirkung der Organe von ROSENFELD **82b)** (bei STEUDEL) gezeigt worden.

Die erste exaktere Untersuchung der N. der Leber hat bei THANNHAUSER

---

82) ***K. Makino,*** Abbau der Nucleinsäure mit ... Rinderniere. Zs. phys. Chem., **232,** 196 (1935). — 82a) ***K. Makino,*** Polynucleotidase. Jl. of Bioch., **22,** 93 (1935). S.A. — 82b) ***L. Rosenfeld,*** Ferm. Abbau der Nucleinsäuren etc. Chemie der Zelle, **12,** 101 (1925).

Abgeschlossen: 1. 2. 36. Ber. Phys. 89, H. 7/8.

DEUTSCH 83) vorgenommen, des Enzyms der Darmschleimhaut LEVENE u. DILLON (l. c. 79). KLEIN 84) hat sie ebenfalls aus Darmschleimhaut gewonnen und nennt sie **Nucleophosphatase**. Besonders geeignet ist die Darmschleimhaut deswegen, weil sie fast frei ist von Nucleosidase. Eine Wirkungstrennung von der Polynucleotidase gelingt durch die Arsenathemmung (KLEIN, l. c. 81) (s. u.).

Den **opt. ph** geben DEUTSCH mit 8,7, LEVENE mit 9,0—9,2 an, ebenso KLEIN. Wie auf viele andere Phosphatasen wirkt **Mg** specifisch aktivirend (DEUTSCH). Diese Nucleotidase ist also die „alkalische" Phosphatase. Daneben werden auch entspr. der sauren Phosphatase saure Optima angegeben, so von CONTARDI (l. c. 70/1) für Reiskleie, und von OTANI 85) für Schimmelpilze (4,2—5,4) neben solchen von 7,2—8,6 (s. a. u.).

Die Zeitumsatzkurve verläuft nach LEVENE innerhalb gewisser Substratkonzz. linear, DEUTSCH fand für längere Zeiten eine Änderung der Kurve nach der SCHÜTZ'schen Regel. — Als **Einheit** nimmt LEVENE die Enzymmenge, die in 1 h bei 30° aus einer 0,161 m Glycerophosphatlösung 1,0 mg P freisetzt (vgl. S. 136).

Eine eigentliche Reinigung resp. präparative Trennung von den anderen Fermenten ist noch kaum versucht. Methodisches der älteren Periode bei LEVENE im H. W. Bd III, S. 933. Künftig wird man die vorgeschrittene Methodik der Phosphatasen verwenden können.

DEUTSCH befreit von überflüssigem Eiweißballast durch Ausfällung bei ph = 4,7, Wiederauflösen bei 8,7; später empfahl er 86) Glycerol-extraktion (87 %ig) in schwach ammoniakal. Lösung; Aktivirung durch Mg. LEVENE fällt Gastro-intestinal-secret von einem Fistelhund mit Aceton, und verwendet das getrocknete Pulver. KLEIN 84) verarbeitet Darmschleimhaut, wie DEUTSCH die Lebersubstanz. — Befreiung von einem natürlichen Hemmungskörper (Glutathion?) durch Acetonbehandlung der Gewebe bei Leber und Tumorgewebe EDLBACHER 88).

Eine vollständige Befreiung von allen Aminasen gelang SCHMIDT (l. c. 95) durch Adsorption des vorgereinigten Leberextraktes (§ 433) mit Tonerde C_γ; dabei gehen alle Aminasen in das Adsorbat, die Nucleotidase bleibt frei.

Sehr wichtig ist die von KLEIN (l. c. 81) entdeckte Tatsache, daß **Arsenate** fast vollständig hemmen.

Es ist dies nur eine mit vielfacher Stärke auftretende Parallelerscheinung zu der bekannten Phosphat-hemmung der Phosphatasen, die aber praktisch wegen der notwendigen großen Mengen nicht durchführbar ist, wenn man die Ansätze — zur Gewinnung der einzelnen Nucleotide — präparativ aufarbeiten will. Arsenat hemmt aber schon bei einer Konz. von 2×10^{-3} m praktisch vollständig. Ebenso hemmen Borate. Auch Glycerol hemmt stark (KLEIN 84)). Weiteres über Aktivirungen und Hemmungen s. bei Phosphatasen (§ 289a).

Eine Aktivirung der „Nuclease" durch Gallensäuren hat OKAMURA 89) angegeben. Da sie durch Abspaltung von PhS gemessen wurde, kann man sie auf Nucleotidase beziehen. Es wirken nur die hydroxylirten Cholansäuren, wie Cholsäure, Desoxycholsäure etc. KURAMOTO 89a) findet dagegen Förderung nur bei ganz geringen Konzz. (ca. 0,01 %), darüber hemmen sie, von 0,1 % ab. Stärkste Aktivirung bei 0,03 durch Taurocholsäure, die erst bei 0,5 % hemmt.

---

83) ***W. Deutsch,*** Lebernukleotidase. Zs. phys. Chem., **171**, 264 (1927). — 84) ***W. Klein,*** Nucleophosphatase. Zs. phys. Chem., **207**, 125 (1932). — 85) ***H. Otani,*** Nucl.-Säure spalt. F. in den Schimmelpilzen. Act. Schol. Med. Kyoto, **17**, 323 (1935); BPh **87**, 653. — 86) ***W. Deutsch, K. Rösler,*** Nucleotidasegehalt einz. Organe etc. Zs. phys. Chem., **185**, 146 (1929). — 87) ***W. Deutsch,*** Wirk. Steig. von Lebernucleotidase. ibid., **186**, 11 (1929). — 88) ***S. Edlbacher, W. Kutscher,*** Phosphatasen. Zs. phys. Chem., **207**, 1 (1932). — 89) ***T. Okamura,*** Einfl. der Gallensäuren auf die Nucleasewirk. Jl. of Biochem., **8**, 391 (1928); Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 245 (1930); BPh **60**, 637. — 89a) ***T. Kuramoto,*** Einfl. der Gallens. auf die Nucl. Verd. Jl. of Biochem., **16**, 141 (1932).

Specifität der Nucleotidase. Nach LEVENE und DILLON handelt es sich um die ganz allgemeine tierische Gewebs-phosphatase mit alkal. Optimum. Das Darmenzym spaltet alle hierhergehörigen Substrate, auch die Zuckerphosphate, ebenso wie die Nucleotide, und zwar alle dargestellten Präparate gleichmäßig. Die Spaltbarkeit der einzelnen Nucleotide verhält sich umgekehrt wie die Säureempfindlichkeit: die Pyrimidin-nucleotide werden schneller zerlegt als die der Purine, am schnellsten Uridylsäure. Jedoch fanden THANNHAUSER u. KLEIN **90)** bei Aktivirung durch Mg eine überaus schnelle Wirkung des Darmferments auf Ribodesose-Adenylsäure; nach 15 Min. ist die Abspaltung vom PhS fast vollständig. Die nativen Nucleinsäuren werden nur sehr wenig angegriffen, was auf die Verschiedenheit der eigtl. Nucleinase von der Nucleotidase deutet.

Was Ribonucleotide und Ribodesoxy-nucleotide anlangt, so hat BIELSCHOWSKI **90a)** angegeben, daß Leberextrakt aus Hefennucl. viel weniger Purine und den P langsamer abspaltet, als aus Thymonucl.; jedoch sind diese Versuche schwer zu deuten, da sie von der unveränderten Nucleinsäure selbst ausgehen. Es hat sich wohl um Differenzen bereits im ersten Abbau gehandelt.

Noch nicht völlig geklärt ist die Spezifitätsfrage für die strukturell abweichende Ergadenylsäure, Adenosin 5-PhS. WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 72) fand, daß Nierenferment diese Säure zwar spaltet, aber langsamer als Monophenyl-PhS. Skelettmuskel spaltet sie praktisch nicht, aber dieser enthält ja überhaupt sehr wenig Phosphatase. REIS **91)** gibt aber an, daß bei Nagern der Skelettmuskel und bei anderen Tieren wenigstens der Herzmuskel ein spezifisches Ferment für die Ergadenylsäure enthält, das auch in anderen Organen vorkommt und 5-Nucleotidase genannt wird. Daneben finden sich verschiedene, aber fast stets sehr kleine Spaltungswerte für Synadenylsäure. Es entspricht dies der allgemein anerkannten Tatsache, daß der Skelettmuskel die Ergadenylsäure erst desaminirt und dann erst die Inosinsäure abbaut (s. z. B. OSTERN **92/3)**). Synadenylsäure wird im Muskel nicht desaminirt. Näh. s. bei Purinaminasen (§ 435). Das würde aber nur bedeuten, daß bei der Ergadenyls. die Desaminirung schneller ist als die hydrolytische Spaltung, daß aber doch eben ein hydrolytisches Enzym vorhanden ist, das das Desaminirungsprodukt zerlegt, und das ist wahrscheinlich doch wieder dasselbe Enzym, das wohl auch die Ergadenylsäure selbst angreifen würde, wenn sie nicht vorher desaminirt wird, und wohl überhaupt die „Nucleotidase" an sich. Für die reine Nucleotidase des Darms gibt tatsächlich KLEIN **94)** an, daß Syn- und Ergadenylsäure mit gleicher Geschwindigkeit zerlegt werden, und daß Arsenat in beiden Fällen die Wirkung aufhebt. Hier handelt es sich also um das gleiche Ferment. Da andererseits auch REIS angibt, daß sich die 5-Nucleotidase in allen äußeren Merkmalen (ph, Mg-Aktivirung, P_s-Kurve) genau so verhält wie die normale Phosphatase, so wird man wohl auch für den Muskel nur ein Ferment für beide Nucleotide annehmen; wahrscheinlich wird die 5-Adenylsäure an sich leichter gespalten als die 3-Adenylsäure, und die Desaminirung, die sonst die Spaltung der Ergadenyls. verschleiert, war irgendwie in diesen Versuchen gehemmt. Ein Versuch mit Muskelextrakt, in dem die Aminasen ausgeschaltet sind, würde diese Frage ohne Weiteres klären.

Eine specifische Nucleotidase für die Guanylsäure gibt SCHMIDT **95)** an. Ein von

---

90) ***S. J. Thannhauser, W. Klein,*** Ribodesose-Adenylsäure. Zs. phys. Chem., **224,** 252 (1934). S.A. — 90a) ***Fr. Bielschowski,*** Ferm. Aufspalt. der Hefennucl. mit Lebernucleotidase. Zs. phys. Chem., **190,** 15 (1930). — 91) ***J. Reis,*** Nucléotidase etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **16,** 385 (1934). — 92) ***P. Ostern,*** Purinkörp. des Kaninchenmusk. Bioch. Zs., **221,** 64 (1930). — 93) ***P. Ostern, T. Mann,*** Mech. der Desamin. im Herzen etc. ibid., **260,** 326 (1933). — 94) ***W. Klein, A. Rossi,*** Ferm. Unt. über den Aufbau des Polynucl.-Mol. Zs. phys. Chem., **231,** 103 (1935). S.A. — 95) ***G. Schmidt,*** Ferm. Abbau der Guanylsäure. Zs. phys. Chem., **208,** 185 (1932). Klin. Ws., **1931,** I, 165.

der Aminase befreites Extrakt aus Kaninchenleber spaltet diese, und nur diese, bei dem abweichenden ph von ca. 5,5; ein zweites Optimum liegt bei 9, während das Optimum für Inosinsäure, wie allgemein angegeben, nur bei 9 liegt. Die Sache ist nicht aufgeklärt, sie hängt mit der ganz allgemeinen Frage der „sauren" Phosphatase in den Geweben, vor Allem in den roten B.K., zusammen, die ebenfalls noch nicht ganz klar ist; sicher ist aber, daß eine solche Phosphatase existirt (S. 140); sie ist auch von KLEIN und ROSSI **94)** bestätigt worden; ebenso findet sie sich in der Reiskleie auch mit Nucleotidasewirkung (CONTARDI, l. c. 70, 71). Ausgesprochene saure Optima auch bei Schimmelpilzen (l. c. 85).

Nucleosidasen. Diese Enzyme, die wir im H. W. im wesentlichen nur nach ihrer Wirkung und ihrem Vorkommen kurz behandeln konnten, sind nun auch deskriptiv etwas näher bekannt geworden. Ihre Specifität im Einzelnen steht noch nicht ganz fest, wohl aber kann man mindestens zwei für die Nucleoside mit Pyrimidinen und Purinen annehmen. Ein specifisch auf Thymin-ribodesosid wirkendes Enzym fand DEUTSCH **96)**, besonders im Knochenmark. KLEIN **97)** hat seine Sonderexistenz bestätigt, es wirkt am eindeutigsten in der Niere (s. u.).

Nucleosidasen sind ausgesprochene Organfermente, fehlen also (meist) im Darm und Blut. Sie können aus den verschiedensten Organen isolirt werden, so aus Pankreas, aus dem sie durch Phosphatpuffer bei ph = 7 oder einfach durch Wasser extrahirt werden können (v. EULER **98), 99)**), oder auch durch Autolyse von Schweinenieren.

Purinnucleosidase, Alle älteren Arbeiten beziehen sich zunächst nur auf dieses Enzym.

Reinigung durch Fällung einiger Verunreinigungen beim isocl. P. mit Essigsäure, Dialyse. Adsorption an Al-Hydroxyd bei ph = 6, Elution mit großen Verlusten. Besser Acetonfällung, erst bei 40 % Ballast, bei 50 % Enzym; so 10fache Reinigung (v. EULER). — LEVENE und WEBER **100)** erzielten eine Reinigung durch koll. $Fe(OH)_3$ und Elution mit Na_2HPO_4 bei ph = 8,75, dann Acetonfällung.

Gewinnung der Nucleosidase nach KLEIN **97)**: Trocknung der Organe in gefrorenem Zustande (CO_2-Äther-Kältemischung) im Vakuum-Exsikkator; dadurch Sprengung der Zellwände, Eiweiß nicht denaturirt, Fermente ohne Schädigung freigelegt. Einmalige Extraktion mit Wasser oder NaCl, 2 h Schütteln. Zentrifugiren, Adsorption an Tonerde C_γ bei schwach saurer Reaktion schon bei sehr wenig Adsorbens vollständig. Wasser eluirt nicht; am besten Arsenat bei ph 6,5—6,7 nach folgender Vorschrift:

4 ccm Fermentlösung werden mit 7 ccm H_2O und 1 ccm (= 13 mg) Tonerde C_γ versetzt, 3 Minuten geschüttelt und zentrifugirt. Der Niederschlag wird einmal mit Wasser gewaschen, dann mit 4 ccm Arsenatlösung m/20, vom p_H = 6,7, verrieben und nach 3 Minuten abzentrifugirt.

Normalansatz 1 ccm des m/20-Arsenateluates, 1 ccm m/5-Arsenat und 5 mg Guanin-Desoxyribosid im Gesamtvolumen von 5 ccm. Die Dauer dieses Versuches ist 30 Minuten.

Adsorption und Elution wiederholt. Das Präparat ist frei von Phosphatase. Reinigung auf etwa den 20fachen Wert. **Stickstoffgehalt** nur 4 %, phosphorfrei.

Ziemlich beständig gegen alkalische R. (ph = 10), sehr empfindlich gegen Säuren (ph 1,2) (LEVENE **100)**). Das dialysirte Enzym ist sehr unbeständig (KLEIN); erst der Arsenatzusatz aktivirt und stabilisirt das Enzym; durch Phosphat nicht voll ersetzbar.

Opt. ph 7,5, Opt. Temp. 37° (LEVENE **101)**). (Abb. bei LEVENE l. c. 1, S. 318) Beim Rein-

---

96) ***W. Deutsch, R. Laser,*** Nucleosidase etc. Zs. phys. Chem., **186**, 1 (1929). — 97) ***W. Klein,*** Nucleotidase. Zs. phys. Chem., **231**, 125 (1935). S.A. — 98) ***H. v. Euler, E. Brunius,*** Reinigungsarbeiten an Nucleosidasen. Ark. f. Kemi, **9**, Nr. 40 (1927). — 99) ***Dies.,*** Nucleosidasen I. Ber. Chem. Ges., **60**, 1584 (1927). — 100) ***P. A. Levene, J. Weber,*** Nucleosidases III. Jl. of Biol. Chem., **60**, 717 (1924). — 101) ***P. A. Levene, M. Yamagawa, J. Weber,*** Nucleosidases I. Jl. of Biol. Chem., **60**, 693 (1924).

ferment KLEIN's 6,5; steiler Abfall nach der sauren Seite. — Bei Schimmelpilzen auch hier nach OTANI (l. c. 84) saure Optima, ca. 5,5. **Spaltprodukte** hemmen (LEVENE **101**)); nach KLEIN am stärksten Guanin und Hypoxanthin, weniger Adenin, sehr schwach Xanthin und Harnsäure; Nucleotide ohne jede Wirkung (KLEIN). Arabinose hemmt nicht (v. EULER **99**)), ebensowenig Ribose und Ribodesose.

Zeit-Umsatz-kurve nach KLEIN nicht monomolekular, Konstanten stark absinkend, trotz sehr hoher Anfangsgeschw. Endspaltung erst nach 24 h. wegen der Hemmung durch Guanin. Im Anfang (1 h) spaltet das Enzym das 15fache Eigengewicht.

Spezifität: Die Purinnucleosidase ist spezifisch eingestellt auf Nucleoside und auf die Purin-komponente; dagegen nicht auf die Zucker: Riboside und Ribodesoside werden mit annähernd gleicher Geschwindigkeit gespalten. Guanin-nucleoside anfangs schneller als Adeninnucleoside, dann — wegen der Guanin-hemmung — langsamer. Das Enzym ist in allen Organen das gleiche (KLEIN).

Pyrimidin-nucleosidase. Das besondere Enzym für die Pyrimidinkörper wurde von DEUTSCH **96**) entdeckt dadurch, daß Knochenmarkenzym die Pyrimidin-nucleoside schneller spaltet, als die der Purine, Niere umgekehrt.

Sie fanden auch einen niedrigeren opt. ph (6,5), was nun nach den Ergebnissen von KLEIN **97**) am gereinigten Purin-Ferment nicht mehr wichtig ist. Aber KLEIN fand, daß sein reines Milzenzym Uridin schwach, die Ribodesoside der Pyrimidine überhaupt nicht angreift. Es gibt also ein besonderes Enzym für die Py-Nucleoside. KLEIN fand es am reichlichsten in der Niere, nicht in der Milz, wie für die Pu-nucleoside. Phosphat aktivirt hier besser als Arsenat. Auch bei der Elution mit Arsenat wird das Enzym kaum aufgenommen, besser mit Phosphat. Deshalb sind die Arsenat-elutionen nach Reinigung fast frei von Py-nucleosidase. Alle Py-nucleoside sind langsamer spaltbar; am besten noch Uridin, dann Thymidin, am schwersten Cytosin-desoxyribosid. Guanin hemmt hier garnicht. Eine genauere Untersuchung dieses Enzyms liegt noch nicht vor.

2) Vorkommen und Bedeutung.

§ 429. Die biologische Bedeutung des Fermentsystems „Nuclease" ist sehr einfach und kurz zu beschreiben, wenn wir rein deskriptiv zusammenfassend aussagen, daß die drei Enzymgruppen nacheinander die Zerlegung des Polynucleotid-Komplexes erst in Nucleotide, dann in Nucleoside und schließlich in die freien Basen katalysiren. Was mit den Zuckern weiter geschieht, ist im Einzelnen nicht zu verfolgen; wir können aber ohne Weiteres annehmen, daß beide in den gesamten Kohlenhydrat-haushalt einbezogen, mit anderen Worten entweder direkt abgebaut oder in Glykogen resp. Stärke umgeformt werden. Die Basen werden desaminirt und schließlich total oxydirt, wobei es an dieser Stelle gleichgiltig ist, ob und in wieweit die Desaminirung bereits an den Nucleotiden ansetzt, und dann die Desamino-nucleotide hydrolytisch zerlegt werden.

Überaus unklar aber sind bisher fast alle feineren Probleme, wenn wir nämlich den Abbau der Nucleinsäuren in das biologische Geschehen einpassen wollen. Davon ist relativ einfach nur noch die Verdauung im Darmkanal. Aber die genauere Schilderung der Stoffwechselprozesse ist noch nicht möglich, so lange wir die biologische Dignität der beiden Typen von Nucleinsäuren nicht kennen und nicht wissen, ob ihnen zwei verschiedene primär wirkende Fermente zugeordnet sind. Wir wissen bisher sicher nur das Eine, daß die Zellkernsubstanzen, die Chromatine, bei den Tieren die eigtl. Zoonucleinsäure enthalten, daß also das darauf

eingestellte Fermentsystem dazu bestimmt ist, den Erhaltungs-stoffwechsel der Zellkerne zu reguliren, wie immer in dem Sinne, daß wir den Fermenten mit experimenteller Sicherheit zwar nur den Abbau, aus allgemeinen Erwägungen aber auch den synthetischen Aufbau zuzuweisen haben. Wir wissen aber heute noch weder, ob bei den Pflanzen die hier vorhandene andere Nucleinsäure wieder die Substanz der Kerne ist, oder ob auch dort die eigtl. Kern-nucleinsäure die Zoo-nucl., dh. die Ribodesoxy-nucl. ist, und die Ribonucl. auch bei den Pflanzen, wie dies bei tierischen Geweben wahrscheinlich ist, ganz andere Zwecke im Stoffwechsel hat, vielleicht sekretorischer Art (vgl. S. 538). Einen sicheren Zweck können wir bei Tieren und bei Mikroben nur den abweichenden „Nucleotiden" zumessen, die als Hilfskatalysatoren im Zuckerabbau („Cozymasen") bedeutungsvoll sind. Nehmen wir nun noch hinzu, daß wir auch über den Stoffwechsel der Chromatine und ihre Bedeutung für das Leben — mit Ausnahme der Befruchtung und Vererbung ganz generell — noch sehr wenig wissen, so steht auch die biologische Würdigung selbst dieser enzymatischen Vorgänge an den echten Zoonucleinsäuren noch ganz grundsätzlichen Problemen gegenüber. Man muß also bei der Schilderung des Vorkommens der Nucleasen noch fast ausschließlich rein deskriptiv vorgehen; warum das eine Gewebe mehr oder weniger der einen oder anderen Gruppe von Nucleasen enthält, ist uns sozusagen noch ganz verschlossen. So haben wir zu den ziemlich verworrenen zahlreichen Angaben des H. W. eigentlich nichts prinzipiell wesentliches zu ergänzen. Über etwa abweichendes Verhalten der Nucleasen bei besonderen Stoffwechsel-lagen oder Krankheiten sind seit den ebenfalls verworrenen Angaben der älteren Zeit keine Befunde angegeben worden. Nachdem nun die Enzyme näher bekannt sind, steht einer kritisch und methodisch sorgfältig vorgehenden Forschung hier sozusagen ein ganz neues Gebiet offen.

Tierische Nucleasen. Am einfachsten liegen noch die Verhältnisse im Darm. Levene hat durch seine Arbeiten über Aufspaltung der Thymonucleinsäure erwiesen, daß die Enzyme in den Fistelsaft übergehen; es sind also wahre Verdauungsfermente. Die Schleimhaut enthält und secernirt praktisch nur zwei Enzyme, die Nucleosidase fehlt (Thannhauser u. Klein, l. c. 90). Die Nucleinase wirkt am langsamsten, bestimmt also das Gesamttempo der Reaktion; die entstehenden Nucleotide zerfallen demgegenüber so schnell, daß sie sich niemals anhäufen können; resorbirt werden somit die Nucleoside; von diesen wird nur das Adenin-ribodesosid vorher desaminirt und als Hypoxanthylglykosid resorbirt; eine zweckmäßige Anpassung, da das Adenin-nucleotid an sich sehr giftig ist (Gefäßgift).

Demgegenüber enthalten natürlich alle **Organgewebe** das komplette System der Nucleasen, wenn auch wohl nach ihren unbekannten Zwecken in verschiedener aktiver Menge und in verschiedenen Relationen. Systematische Untersuchungen liegen kaum vor und sind nach dem einleitend Gesagten ja bisher auch kaum möglich.

Vergleichende Angaben z. B. bei Jono **102**): reichlich in Leber, Pankreas, Milz, Niere, Dünndarm; sehr spärlich in Blut und Muskel.

Nucleotidase fand Deutsch (l. c. 86) am meisten in Leucocyten, dann Leber (Rind, Mensch), dann folgen Niere und Dünndarm; sehr arm sind Pankreas, Milz, Thymus, Blut.

Die von Deutsch (l. c. 96) entdeckte Pyrimidin-nucleosidase fand er am reichlichsten im Knochenmark, von Vorstufen der Leukocyten abgegeben; jedoch ist nach Klein (l. c. 97) die Niere am reichsten, während die Milz viel reicher an Purin-nucleosidase ist.

Klein (l. c. 97) fand Nucleosidase in allen Organen, Darmschleimhaut meist sehr gering, aber Ausnahmen (s. Tabelle).

---

102) *Y. Jono*, Nucleinsäure spalt. Ferm. Acta Schol. Med. Kyoto, **13**, 162 (1930). S.A.

Gehalt der Organe an Purin-nucleosidase nach KLEIN 97).

Nr.	Organ	Anfangswert	Spaltung ccm	Trockengewicht	Reduzirte Spaltung
1	Milz	0,90	2,94	6,5	52
2	„ (Rind)	0,95	2,92	6,3	53
3	Lunge	0,55	2,73	6,7	47
4	Lymphdrüse	0,45	1,22	7,1	20
5	Rotes Knochenmark	0,35	1,19	6,0	23
6	„ „ (Rind)	0,45	1,37	6,3	25
7	Leber	1,65	2,58	6,4	46
8	Thymus	1,10	2,00	8,5	27
9	Magenschleimhaut	0,80	1,75	8,4	24
10	Darmschleimhaut	1,25	0,25	8,2	3
11	„ bes. Fall	1,10	0,93	7,4	15
12	Pankreas	1,20	1,80	8,5	24
13	Niere	1,15	1,32	6,9	22
14	Hoden (Stier)	0,65	1,36	8,3	19
15	Herzmuskel	0,80	2,42	6,7	42
16	Skelettmuskel	1,05	1,85	6,4	24
17	Gehirn	0,70	1,32	6,8	22

Von **einzelnen Organen** ist mit am häufigsten die **Niere** untersucht.

Polynucleotidase ist anscheinend nicht reichlich vorhanden, wenigstens wird für die „Phosphatase" der Niere angegeben (z. B. **105**)), daß sie Zoonucleinsäure nur langsam spaltet im Verhältnis zu den Nucleotiden und der Phytonucl., die hier wohl wieder spontan zerfällt. MAKINO (l. c. 82) nimmt freilich nach seinen Versuchen an Hefennucl. (ph = 8,2) eine Polynucleotidase an. Er fand besonders wirksam eine Nucleosidase für Adenosin, so daß dies ganz gespalten wird, während Guanosin z. T. erhalten bleibt, ebenso Uridin.

Eine nicht sehr wirksame Nucleotidase für Ergadenylsäure fand WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 72).

Beim **Muskel** liegen die Verhältnisse dadurch komplicirt, daß hier die Ergadenylsäure und ihre Pyrophosphorsäure das Feld beherrschen. Das Enzym für die letztere ist wahrscheinlich specifisch. Ergadenylsäure wird wie es scheint stets vor der weiteren Spaltung desaminirt, Inosinsäure gespalten; aber Nucleotidasen sind überhaupt spärlich vertreten, mehr im Herzmuskel, wo noch eine specifische Nucleotidase für Ergadenylsäure vorhanden sein soll (l. c. 91). Guanylsäure scheint Muskelsaft garnicht anzugreifen (SCHMIDT **106**)). Nucleosidasen sind vorhanden (KLEIN, s. Tabelle). Bei tumorkranken Tieren findet sich eine sehr kräftige Nucleotidase im an sich gesunden Muskel (l. c. 110, 111) (vielleicht eine eingewanderte besondere Tumor-phosphatase?).

Blutserum soll nach älteren Angaben (*l. c. 55, 56*) Nucleinsäure (Hefe) angreifen; neuere Arbeiten habe ich nicht aufgefunden.

Gehirn, vor allem graue Substanz, Gesamtnuclease TAKASAKA **107**).

Haut: Nucleotidasen WOHLGEMUTH **108**); Spaltung von Hefen-nucleinsäure; besonders reichlich in der Haut der Fußsohle und bei Säuglingen.

Placenta stark wirksam, wie Tumoren (EDLBACHER, s. u.).

Brustdrüse, vor Allem während der Lactation TATEYAMA **109**).

105) ***H. D. Jenner, H. D. Kay,*** Phosphatases of mamm. tissues. Jl. of Biol. Chem., **93**, 733 (1931). — 106) ***G. Schmidt,*** Ferm. Desamin. im Muskel. Zs. phys. Chem., **179**, 243 (1928). — 107) ***T. Takasaka,*** Ferm.-Geh. des menschl. Gehirns. Bioch. Zs., **184**, 390 (1927). — 108) ***J. Wohlgemuth, E. Klopstock,*** Ferm. der Haut II (Nucleotidase). Bioch. Zs., **158**, 487 (1924). — 109) ***R. Tateyama,*** Ferm. in der menschl. Brustdrüse. Bioch. Zs., **168**, 297 (1926).

Tumoren (sowohl menschliche wie Impftumoren) fanden EDLBACHER u. KUTSCHER **110)** stark wirksam auf beide Nucleinsäuren. Auch nekrotische Teile zeigen starke Spaltung **110a)**. Muskulatur von Sarkom-ratten zeigte ebenfalls eine sehr starke Wirkung, bestätigt von WIENBECK **111)**. Komplexbildner wie Cystein, Glutathion, HCN hemmen (vgl. S. 151). Glutathion bildet wahrscheinlich einen natürlichen Hemmungskörper, der durch Aceton entfernt werden kann. Auffallend ist die Resistenz dieser „Phosphatase" gegen NaF; es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich hier um eine im System veränderte Phosphatase handelt (vgl. S. 146); nach EDLBACHER ist sie von der der Leber nicht zu unterscheiden.

Beim JENSEN-Sarkom sowohl im nekrotischen wie im freien Gewebe als Anzeichen gesteigerter Zellteilung; im nekrotischen Gewebe dagegen als Begleiterscheinung des Kernsubstanz-abbaus. Cystein hemmt in beiden Fällen.

Bei einem Hühnertumor fand MAC FADYEN **111a)** Spaltung von Hefen-nucl. zu 44 % in einer Woche bei ph 6,5. Das Gewebe war fast so wirksam wie Milz. Bei der Zerlegung von Thymonucl. durch Carcinomgewebe tritt nach GURWITSCH **112)** **mitogenetische Strahlung** auf, mit bestimmtem, vom „glykolytischen" abweichenden Spektrum.

Wirbellose: Totaler Zerfall der Nucl. bei *Hirudo* und der Muschel *Anodonta* einschl. Desaminirung der Purine fand TRUSZKOWSKI **113)**.

Phanerogamen. Hier sind genau wie in Tiergeweben Nucleasen überall in aktiven Geweben zu finden, wenn man sie sucht, was bisher selten geschehen ist.

„Nuclease" fand IONO (l. c. 102) besonders reichlich in jungen Blättern, Wurzeln und Samen, weniger in Früchten, so wirkten Sojabohnenmehl und Preßsaft aus Spinat auf beide Nucleinsäuren (opt. ph = 6,2); Nucleosidase scheint nach den erhaltenen Spaltprodukten sehr wenig wirksam zu sein **(114)**.

Kryptogamen. Bei Hymenomyceten MELIN **115)**, und zwar bei Mycorrhizen der Waldbäume (*Boletus*, *Tricholoma* u. a.); am reichlichsten bei *Boletus luteus* und *variegatus*, viel schwächer *Russula rubra*. Eine eingehende Untersuchung des Enzymsystems der Hefe hat HAEHN **116)** durchgeführt. Sie spaltet Hefennucleinsäure total, optimal bei ph = 8, und liefert alle Spaltprodukte, z. T. in desaminirtem Zustande.

Nach OTANI **117)** bauen alle untersuchten Schimmelpilze Nucl. ab. Bei *Rhizopus tonkinensis* Wirkung schwach, Nucleosidase fehlt. ph meist im sauren Gebiet, aber sehr verschieden, auch verschieden für Nucleotidase (P-Abspaltung) und Nucleosidase (Purinbasen).

Bakterien: *Bac. proteus* baut beide Nucleinsäuren total ab; neben Thymin werden die desaminirten Basen erhalten (JONO **118)**).

---

110) ***S. Edlbacher, W. Kutscher,*** Stoffw. der Tumoren II—IV. Zs. phys. Chem., **199**, 200 (1931), **207**, 1 (1932), **227**, 99 (1934). S.A. — 110a) ***S. Edlbacher, F. Koller,*** Stoffw. der Tumoren. Zs. phys. Chem., **227**, 99 (1934). S.A. — 111) ***J. Wienbeck,*** Phosphatasegeh. des Muskels tumorkranker Tiere. Zs. phys. Chem., **219**, 164 (1933). — 111a) ***D. A. Mac Fadyen,*** Eff. of ... chicken tumor I on yeast nucl. acid. Jl. of exp. Med., **60**, 361 (1934). — 112) ***A. Gurwitsch c. s.,*** Mitogen. Spektrum der Nucleins.-Spalt. Biochem. Zs., **246**, 124 (1932). — 113) ***R. Truszkowski,*** Purinolyt. enz. of ... hirudo and ... anodonta. Biochem. Jl., **22**, 1299 (1928). — 114) ***Y. Jono,*** Part. Hydrol. von Nucleins. durch pflanzl. Nuclease. Act. Schol. Med. Kyoto, **13**, 182 (1930). S.A. — 115) ***E. Melin, K. Helleberg,*** Aktivit. von ... Enz. bei Hymenomyceten. Bioch. Zs., **157**, 146 (1925). — 116) ***H. Haehn, H. Leopold,*** Spalt. der Nucleinsäure bei der Hefenautolyse. Ferm.-Forsch., **14**, 539 (1935). S.A. — 117) ***H. Otani,*** Nucl.-Säure spalt. F. in den Schimmelpilzen. Act. Schol. Med. Kyoto, **17**, 323 (1935); BPh **87**, 653. — 118) ***Y. Jono,*** Abbau von Nucl. durch Proteusbacillen. Act. Schol. Med. Kyoto, **13**, 176 (1930). S.A.

XI. Hauptteil.

Amidasen.

Allgemeines, Einteilung.

§ 431. Wir haben im H.W. S. 777 vorgeschlagen, mit dem Hauptnamen Amidasen alle Enzyme zu bezeichnen, die hydrolytisch die **Bindung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff** lösen. Ein Widerspruch gegen diese Benennung ist nicht erfolgt, es ist auch kein anderer Hauptname vorgeschlagen worden, obwohl ich dies selbst sehr begrüßt hätte. Denn der Name ist insofern nicht sehr gut, als nach dem Nomenclatur-prinzip Substrate dieser Fermente eben Amide sein müßten, d. h. nach der gebräuchlichen Bezeichnung Säureamide mit der typischen Bindung R·CO—NH·R'. Da es aber für die Kohlenstoff-Stickstoff-bindung resp. die diese tragende große Körperklasse keinen gemeinsamen Namen gibt, so versagt hier das Nomenclaturprinzip der Fermente, und man ist gezwungen, etwas diktatorisch vorzugehen. Lehnt man den Namen Amidasen wegen seiner ihm innewohnenden Beschränkung ab, so könnte man rein systematisirend den Namen **Carbazasen** vorschlagen.

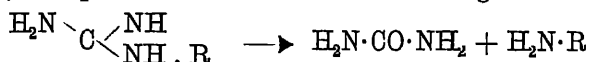
Ich überlasse dies dem Urteil der Fachwelt und bemerke dazu nur noch eins: der Name Amidasen ist insofern etwas beweglicher, als er die Möglichkeit gibt, ihn auf andere Stickstoffbindungen lösende Fermente zu erweitern, ebenso wie dies bei den Esterasen gegangen ist. Erst verstand man darunter nur organische Ester spaltende Fermente; heute sind die Phosphatasen und Sulfatasen hinzugekommen. So bietet der Obertitel Amidasen die Möglichkeit, vorerst als Anhang die noch kaum bekannte Gruppe der **Phosphamidasen** unterzubringen, welche Bindungen zwischen P und N in den Phosphagenen löst. Noch lohnt sich hierfür eine weitere Teilung nicht; entwickelt sich das Gebiet weiter, so kann man später unter den Amidasen noch Carbamidasen und Phosphamidasen trennen.

Betrachten wir also vorläufig als **Amidasen** alle Enzyme, die hydrolytisch Stickstoff vom Kohlenstoff ablösen, so ergibt sich nach den modernen Erkenntnissen folgende Unterteilung:

I. Carbaminasen oder einfacher **Aminasen** sind die Enzyme, welche hydrolytisch eine Aminbindung lösen, d. h. R—NH_2 oder R—NH—R'. Im ersteren Fall geht die primäre Aminogruppe als NH_3 fort, im letzteren Falle entstehen wiederum Amine (resp. Aminosäuren oder dgl.). Zu dieser Unterklasse gehören drei Gruppen:

1) **Nucleinaminasen,** enthaltend alle Einzelenzyme, welche die Abbauprodukte der Nucleinsäure und analog gebaute Stoffe desaminiren, sei es die freien Basen selbst (Guanase, Adenase, Cytosinase), sei es die Nucleoside (vielleicht dieselben Enzyme) und endlich die Nucleotide. Der hier vielfach gebrauchte Name „Desaminasen" ist nach den Nomenclaturprinzipien falsch, und die Silbe verlängert die Einzelbezeichnungen in überflüssiger Weise.

2) **Arginase**, ein specifisch auf die Struktur des Arginins

$$H_2N\diagdown C \langle {NH \atop NH.R} \longrightarrow H_2N\cdot CO\cdot NH_2 + H_2N\cdot R$$

eingestelltes Enzym, das zwischen dem C und der secundären Aminogruppe spaltet.

3) **Cycloaminasen**, welche Ringbindungen des N lösen, von denen bisher nur die **Histidase** etwas näher bekannt ist. Es ist aber nicht unwahrscheinlich, daß es solche Enzyme auch für den Pyrrolkern und Pyrimidinkern gibt; das Schicksal dieser Stoffe im Stoffwechsel ist bisher unbekannt; vielleicht werden sie aber wie der Purinkern gleich oxydativ gespalten.

II. **Acylamidasen** (vgl. GRASSMANN 1)) sind die Fermente, welche Säureamide spalten, also die Bindung $R\cdot CO—NH_2$ oder $R\cdot CO—NH\cdot R'$. Wieder entsteht je nachdem freies NH_3, so wenn einfache Säureamide das Substrat bilden, oder es treten Aminoverbindungen auf. Hierher gehören folgende Gruppen:

1) die noch sehr wenig bekannten Enzyme, die **einfache Amide**, wie Acetamid, Oxamid, Benzamid spalten; ferner die Amide der Aminosäuren u. Ä.

2) **Asparaginase** mit strenger Spezifität auf die Amidbindung im Asparagin; ferner gibt es in dieser Gruppe noch ein Parallelenzym für Glutamin.

3) **Urease** mit ebenfalls strenger Specifität auf Carbamid (Harnstoff).

4) Die auf **sekundäre Amide** wirkenden Enzyme, von ABDERHALDEN **Acylasen** genannt. Sie gruppiren sich um das alte Histozym, die **Hippuricase**, herum, die Benzoylglycin $C_6H_5CO.NH.CH_2.COOH$, zerlegt. Es gibt aber wahrscheinlich eine ganze Anzahl ähnlich wirkender Enzyme für acylirte Aminosäuren; nach GRASSMANN kann man sie systematisch zu den Peptidasen stellen, da die Affinität auf die Aminosäure gerichtet ist.

5) Hierher gehört nämlich auch rein systematisch betrachtet die ganze so ungemein wichtige Gruppe der **Proteasen**. Wir wissen heute — im Gegensatz zu früheren Annahmen und auch zu meinen eigenen Annahmen im H.W. S. 778 — daß jegliche Wirkung der Proteasen auf der Lösung einer Polypeptidbindung mit Freilegung gleichzeitig je einer Aminogruppe und eines Carboxyls beruht. Dafür ist es ganz gleichgiltig, ob wir eine Peptidase oder eine Proteinase betrachten. Die Polypeptidbindung aber ist immer eine secundäre Amidbindung, nämlich

$$H_2N\cdot \underset{R}{CH}\cdot CO — NH\cdot \underset{R'}{CH}\cdot COOH;$$

bei den Derivaten des Glycins ist eben $R' = H$, und so ist theoretisch der Anschluß an die Hippuricase u. a. Enzyme hergestellt. Daß wir die Proteasen als eigene große Klasse von Fermenten behandeln, ist ausschließlich durch ihre überragende Wichtigkeit und Mannigfaltigkeit bedingt und erforderlich.

Die endgültige Abgrenzung dieser Hauptgruppe Amidasen stößt auf unüberwindliche Schwierigkeiten wegen einiger an den Grenzen stehenden Erscheinungen.

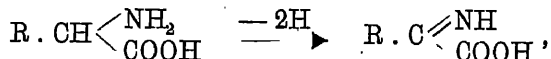
Erstens gibt es ein Enzym **Aspartase** mit einer ganz isolirt dastehenden Wirkung, die im bisherigen System insofern überhaupt nicht unterzubringen ist, als es sich weder um eine Hydrolyse, noch um eine Oxydation (resp. Dehydrirung) handelt. Dieses Enzym katalysirt nämlich die umkehrbare Reaktion Fumarsäure + $NH_3 \rightleftarrows$ Asparaginsäure ohne jede erkennbare Mitwirkung von Wasser, wenn auch natürlich nur in wässeriger Lösung. Sie bewirkt mithin schematisch genau dieselbe Reaktion wie die „Fumarase", welche die ebenfalls umkehrbare Reaktion Fumarsäure + $H_2O \rightleftarrows$ Äpfelsäure katalysirt. Diese „Hydratasen"

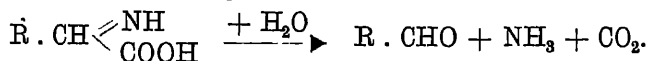
---

1) *W. Graßmann*, Amidasen. Hb. der Biochem., Erg. Werk Bd. I, S. 460. Jena 1933.

werden wir erst bei den Desmolasen besprechen, es gibt ihrer wahrscheinlich noch mehr; es sind Hilfsfermente der Desmolyse, welche die Zwischenprodukte, hier die Fumarsäure, durch Anlagerung von Wasser reif machen zur erneuten Dehydrirung. Die Aspartase ist wahrscheinlich vorwiegend ein Enzym des Aufbaus von Aminosäuren; aber wohin man sie systematisch stellen soll, ist bisher unerfindlich. Wir werden sie als Anhang zur Asparaginase behandeln.

Ein weiteres für die Systematik überaus unbequemes Kapitel ist die enzymatische **Desaminirung der Aminosäuren.** Wir wissen heute so gut wie sicher, daß sie ein enzymatischer Prozeß ist mit specifischen Enzymen, und wir wissen schon lange ganz sicher (H.W. S. 795), daß es sich hier nicht um einen rein hydrolytischen Prozeß handelt, sondern eine Dehydrirung. Als solcher gehört er also garnicht hierher, und wir werden die noch sehr wenig bekannten specifischen Dehydrasen (KREBS) bei den anderen Dehydrasen finden. Aber die Schwierigkeit liegt darin, daß diese primäre Dehydrirung ja noch keine „Desaminirung" ist. Auf die primäre Reaktion

$$R.CH\langle{}^{NH_2}_{COOH} \xrightarrow{-2H} R.C\langle{}^{NH}_{COOH},$$

bei der also die Iminogruppe entsteht, muß ja dann erst hydrolytisch die wirkliche Abspaltung des N als NH_3 erfolgen:

$$R.CH\langle{}^{NH}_{COOH} \xrightarrow{+H_2O} R.CHO + NH_3 + CO_2.$$

Wir haben bisher nicht die geringste Vorstellung, ob dieser zweite Akt spontan erfolgt, oder ob noch eine besondere „Imidase" dazu nötig ist. Nur das Eine steht fest, daß es eine direkte hydrolytische (anaerobe) Desaminirung wie etwa bei den Purinen hier nicht gibt, eine „Aminoacidase" in diesem Sinne ist nicht nachzuweisen; und da wir eben die „Imidase" auch nicht kennen, so haben wir hier den ganzen Fragenkomplex der enzymatischen Desaminirung nicht zu behandeln, müssen vielmehr die ganze Diskussion auf die Behandlung bei den Dehydrasen verschieben.

Die Tyrosinase, die wir im H.W. hier S. 795 mit behandelt haben, ist überhaupt keine Amino-acidase, wie schon im H.W. § 998 richtiggestellt werden konnte.

An die eigentlichen Aminoacidasen im Sinne einer dehydrirenden Iminbildung schließen sich noch einige Enzyme an, die in ganz analoger Weise einige decarboxylirte cyclische Aminosäuren oxydativ desaminiren: Tyraminase und wohl auch Histaminase. Auch diese werden wir infolgedessen mit bei den Dehydrasen behandeln, die Histaminase, bei der die Sachlage noch nicht ganz klar ist, hier vorläufig als Anhang zur Histidase kurz vorwegnehmen.

Diese systematischen Erwägungen bedingen gegenüber dem H.W. einige unwesentliche Änderungen der Einteilung. Wir teilen den XI. H.T. in die beiden oben erwähnten Teile und beginnen mit den Aminasen.

A. Aminasen (Carbaminasen).

§ 432. Es sei kurz rekapitulirt, daß wir unter Aminasen verstehen wollen alle Enzyme, die Kohlenstoff-Stickstoffbindungen in anderer Bindung als in Säureamiden spalten, also $R \cdot NH_2$, $R \cdot NH \cdot R'$ oder Ringbindungen C—N.

I. Nucleinaminasen.

(*H.W.* § *450*). Diese Gruppe von Fermenten setzt da ein, wo es sich darum handelt, die zunächst rein hydrolytisch entstandenen Abbauprodukte der Nucleinsäuren, sowie die isolirt dastehende Ergadenylsäure, zum weiteren Abbau vorzubereiten. Es wird dabei nur der relativ lose Stickstoff der Aminogruppen entfernt; was dann verbleibt, sind die Oxy-purine und Oxy-pyrimidine, die dann durch dehydrirende Enzyme weiter in Harnsäure und Allantoin übergeführt werden. Diese letzte Vorstufe sind also jedenfalls die drei freien Oxybasen: Hypoxanthin, Xanthin und Uracil; verschieden ist nur der Weg ihrer Entstehung. Denn die Desaminirung kann je nach den Bedingungen ebensowohl an der Base selbst ansetzen, wie am Nucleosid oder Nucleotid; der hydrolytische Zerfall erfolgt dann secundär. Durch diese verschiedenen Möglichkeiten, die wieder verschiedene Enzyme erfordern, wird das Bild des desaminirenden Nucleinabbaus sehr verwickelt. Nähere Kenntnisse haben wir bisher nur über die Desaminirung der Purin-Körper; die der Pyrimidinkörper ist noch wenig erforscht. Da aber schon für die Adenin- und die Guaningruppe zwei verschiedene Enzyme vorhanden sind, wird man bis zum Beweis des Gegenteils annehmen dürfen, daß auch für die Pyrimidingruppe eigene Fermente gegeben sind, vielleicht auch hier für Cytosin und Cytidylsäure verschieden.

Es muß noch bemerkt werden, daß über die enzymatische Desaminirung der Abkömmlinge der Thymonucleinsäure noch kaum etwas bekannt ist. Einzelangaben liegen vor, so die Nicht-angreifbarkeit der betr. Adenylsäure, aber systematische Untersuchungen fehlen. Eine bei Schmidt ausgeführte Arbeit von Büding werden wir kurz anführen (l. c. 7[b]); sie gibt nur einige Hinweise.

1) Purinaminasen, Nucleosidaminasen.

Allgemeines.

Für die Desaminirung der freien Purine und der Purinnucleoside, je zwei des Adenins und Guanins mit Ribose und Ribodesose, gibt es allem Anschein nach nur je ein Enzym: **Guanase** und **Adenosinase**. Die im H.W. S. 799 beschriebenen fast unübersehbaren Wirrnisse scheinen, in der Hauptsache durch die exakten Untersuchungen von G. Schmidt 2—4) (bei Embden), ihre Klärung wie folgt gefunden zu haben:

---

2) ***G. Schmidt,*** Ferm. Desamin. im Muskel. Zs. phys. Chem., **179**, 243 (1928). — 3) ***Ders.,*** Abbau des Guaninkerns durch das F. der Kaninchenleber. Klin. Ws., **1931**, 165. — 4) ***Ders.,*** Ferm. Abbau der Guanylsäure etc. Zs. phys. Chem., **208**, 185 (1932).

Freies Adenin wird durch die üblichen Organextrakte so gut wie garnicht angegriffen, wohl aber (auch im Muskel) Adenosin (GYÖRGY 5)). Es gibt hier wohl sicher nur ein Enzym, eine Adenosinase mit ganz betonter Affinität zum Adenosin, d. h. dem Adenin-ribosid, und auch zum Adenin-ribodesosid.

Es wird also nötig sein, auch die seltenen Befunde über Angreifen von freiem Adenin in anderen Objekten als den üblichen nochmals nachzuprüfen, und eventuelle Verschiebungen der relativen Specifität aufzudecken (Vorkommen eines auf freies Adenin wirkenden Ferments in Embryonen, Milch, bei Wirbellosen). Meist wurde aber auch schon vor SCHMIDT der Angriff freien Adenins vermißt, wie denn ja auch verfüttertes Adenin nicht desaminirt wird. Jedenfalls fehlt also eine eigtl. „Adenase" im Muskel und in der Leber.

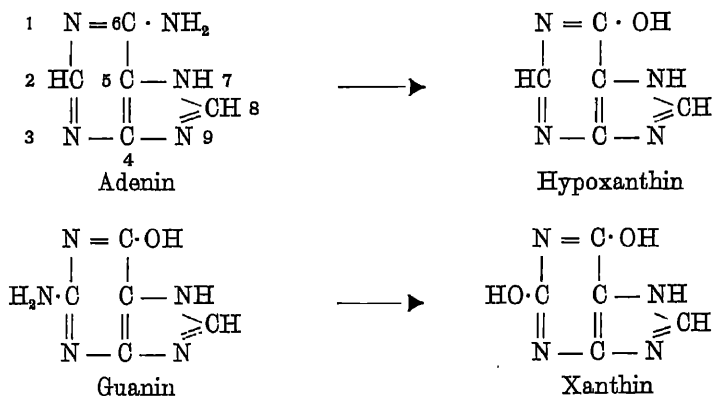
Dagegen scheint **Guanase** sowohl Guanin wie auch Guanosin zu desaminiren. Da indessen diese Vereinheitlichung vielfachen älteren Angaben widerspricht, so müßte das erst noch genauer geprüft werden. Z. B. soll Pankreas zwar Guanin, aber nicht Guanosin angreifen (JONES, *l. c. 212/3*), Schweineleber sich umgekehrt verhalten (*l. c. 214*).

Adenosinase und Guanase sind verschiedene, präparativ trennbare Enzyme; und beide sind wieder verschieden von den entsprechenden Nucleotidaminasen, Adenylsäure-aminase und Guanylsäure-aminase. Bei der ersteren tritt als weitere Komplikation auf, daß wieder für Ergadenylsäure und Synadenylsäure ganz verschiedene Aminasen nötig sind, resp. die letztere vielleicht garnicht existirt, so daß hier vielleicht nicht nur wie sicher vorwiegend, sondern ausschließlich erst nach Abspaltung von PhS das Nucleosid desaminirt wird.

Für eine Verschiedenheit der Enzyme, welche die Nucleosidase mit Ribodesose angreifen, liegen entscheidende Argumente nicht vor. Wahrscheinlich ist die Natur des Zuckers hier ebensowenig von Belang wie für die hydrolytische Spaltung durch Phosphatase oder Nucleosidase.

Zur Orientirung über den Verlauf der beiden Reaktionen seien hier die Formeln angegeben; unter Benutzung der Enolformeln für die Purine ist die Deaminirung als ein ganz einfacher Ersatz des NH_2 in 6 resp. 2 durch OH zu schreiben. Die Position des H in 7 oder 9 ist willkürlich, da Desmotropie vorliegt (S. 534).

```
1  N =6C · NH2                    N = C · OH
   |    |                         |    |
2  HC  5C — NH 7    ——→          HC    C — NH
   ||   ||    >CH 8               ||   ||    >CH
3  N — C — N 9                    N — C — N
       4
    Adenin                          Hypoxanthin

     N = C·OH                       N = C·OH
     |    |                         |    |
H2N·C    C — NH     ——→       HO·C     C — NH
    ||   ||    >CH                ||   ||    >CH
     N — C — N                      N — C — N
      Guanin                          Xanthin
```

Von den beiden Reaktionen verläuft bei den Nucleosiden die Abspaltung der Aminogruppe leichter an C_6 als an C_2. Es werden also Adenosin (auch Cytosin, s. § 436) schneller desaminirt als Guanosin und zwar ebensowohl durch Leber (BIELSCHOWSKI 6)) wie durch Niere (MAKINO 7)).

5) ***P. Györgi, H. Röthler***, Ammoniakbild. in den Geweben. Bioch. Zs., **187**, 194 (1927). — 6) ***Fr. Bielschowski***, Ferm. Aufspalt. der Hefennucleinsäure etc. Zs. phys. Chem., **190**, 15 (1930). — 7) ***K. Makino***, Abbau der Nucleinsäure mit . . . Rinderniere. Bioch. Zs., **282**, 196 (1935). S.A.

MAKINO fand zwar noch Guanosin und Guanin als Endprodukte vor, aber kein Adenosin, dafür nur freies Hypoxanthin. Diese Bevorzugung des C_2 ist sehr merkwürdig insofern, als bei den freien Basen, sowohl Adenin wie Cytosin, grade diese Stellung des NH_2 die enzymatische Desaminirung verhindert, während Guanin angegriffen wird.

a) Darstellung und Eigenschaften.

§ 433. Material für die Gewinnung von Adenosinase ist der Muskel, der nach SCHMIDT 2) Guanase nicht enthält. Das Enzym ist ziemlich fest gebunden, muß mit schwach sauren Salzlösungen (Lactatpuffer bei ph ca. 6) oder durch Aufschluß mit Papain freigelegt werden, so daß bei der einfachen Extraktion mit 2 % $NaHCO_3$ fast nur Adenylsäure-aminase herausgeht (§ 435); am besten wirkt Papain. Später hat dann SCHMIDT 4) Leber verwendet, die beide Gruppen enthält, so daß weitere Trennungen nötig werden.

Das Aceton-Leberextrakt wird zunächst mit $Fe(OH)_3$ oder Pb-Acetat, dann Kaolin vorgereinigt, dann mit Tonerde $C\gamma$ die sämtlichen Enzyme außer der Phosphatase adsorbirt, und mit n/5 Na-Phosphat Guanase und Adenosinase eluirt; die Nucleotidaminasen bleiben fast quantitativ am Adsorbens; ebenso meist die Cytidin-aminase.

Eine Trennung von Guanase und Adenosinase gelingt dadurch, daß aus dem ersten Adsorbat die Adenosinase auch durch saure Elution herauszubekommen ist, die Guanase nur durch alkalische. SCHMIDT extrahirt also bei ph = 5,1 mit KH_2PO_4 erst die Adenosinase, dann mit n/5 Na_2HPO_4 die Guanase, die freilich dann immer noch etwas Adenosinase enthält.

Darstellung von wirkungsreiner Guanase nach SCHMIDT 7a): Zerhackte Leber mit der doppelten Menge Glycerol 1 h geschüttelt, verdünnt, mit Kieselgur versetzt, abgenutscht. 20 ccm auf 100 verdünnt, mit 10 cm^3 Tonerde $C\gamma$ versetzt. Zentrifugirt, gewaschen, 10 ccm N/5 Na-Phosphat geschüttelt, zentrifugirt. Wirkt garnicht auf Adenylsäure, kaum auf Guanylsäure (Adenosin-aminase ist noch darin enthalten). Kann dazu dienen, in Geweben nach Säurehydrolyse freies Guanin quantitativ zu bestimmen, da ja Adenin ohnehin nicht enzymatisch angegriffen wird.

Über die Aminasen der Thymonucleinsäure ist kaum etwas bekannt; eine Arbeit von BÜDING 7b) (bei SCHMIDT) ist nur ein tastender Versuch. Er erhielt aus Acetonleber-präparaten ein Enzymsystem, das aus einem wasserlöslichen und einem unlöslichen Anteil besteht; beide thermolabil; nur beide zusammen desaminiren Thymonucleinsäure, wobei sich ein Teil der Vorgänge am Guaninkern abspielt; wahrscheinlich findet hier auch am Guanylkern die Desaminirung erst im Nucleosidstadium statt, und die beiden thermolabilen Faktoren sind die beiden zur Zerlegung und Desaminirung nötigen Enzyme.

Opt. ph: Adenosinase 6,2; Guanase 9,2. **Fluor** wirkt auf Guanase im Gegensatz zur entspr. Nucleotid-aminase erst bei hoher Konz. (n/10) hemmend (SCHMIDT). Durch geringe Mengen Silber-Ion (ca. 10^{-2} Mol je Liter) kann man nach KLEIN 8) die Aminasen ausschalten, so daß die durch die Nucleotidase entstandenen Nucleoside nicht weiter zerfallen, sondern präparativ erhalten werden können.

Kinetik: Geschwindigkeit etwa proportional der Enzymmenge (SCHMIDT), unabhängig von Lösungsvolumen und Substratkonz.

b) Vorkommen und Bedeutung.

§ 434. Die Aminasen der Purin-nucleoside haben natürlich im Stoffwechsel ihre ganz bestimmte Bedeutung; es ist aber bisher noch nicht ganz einfach, ihr Eingreifen gegenüber den entspr. Nucleotidasen genau abzuschätzen. Es liegt ja hier die eigentümliche Sachlage vor, daß vom Nucleotid als dem zweifellos ersten Abbauprodukt der

---

7a) *G. Schmidt,* Mikrobest. von Purinsubst. in Geweben. Zs. phys. Chem., **208**, 225 (1932). — 7b) *E. Büding,* Ferm. Ammoniak-Abspalt. aus Thymonucl. Zs. phys. Chem., **222**, 6 (1933). — 8) *W. Klein,* Adenindesoxyribosid. Zs. phys. Chem., **224**, 244 (1934). S.A.

Nucleoproteide zum desaminirten Nucleosid und schließlich zur freien Base zwei Wege zur Wahl stehen: entweder erst Dephosphorylirung und dann Desaminirung, oder erst Desaminirung am Nucleotid selbst und dann Hydrolyse. Der erstere Modus ist also das Gebiet der Nucleosid-aminasen nach der Wirkung der Phosphatasen. Wir können noch nicht exakt klarstellen, welcher Weg im Allgemeinen bevorzugt wird. Bei den Guanylkörpern scheinen beide etwa gleichen Ranges zu sein, jedoch sind die Verhältnisse schwierig zu verfolgen. Bei den Adeninkörpern scheint dagegen der eigentliche Nucleinstoffwechsel ganz betont, vielleicht ausschließlich so zu verlaufen, daß das Nucleotid gespalten und das Ribodesoxy-adenosin desaminirt wird; und das gleiche tritt ein, wenn man Adenyl-ribosid-3-PhS, das Nucleotid aus Phytonucleinsäure, enzymatisch zerlegt. Dagegen verläuft die sehr wichtige, aber nicht dem eigtl. Nucleinstoffwechsel angehörige Umsetzung der Ergadenylsäure betont, im Skelettmuskel fast ausschließlich auf dem anderen Wege; es wird das Nucleotidstadium desaminirt (§ 435).

Die Purin-aminasen sind also weit verbreitete Organfermente, aber anscheinend ungleich verteilt. Neuere Untersuchungen mit exakter Methodik über die Verteilung in den einzelnen Organen liegen nicht vor; die älteren im H.W. gegebenen Daten sind nur mit großer Vorsicht noch zu verwerten.

Die wichtigste derartige Beobachtung ist das Fehlen der Guanosin-aminase im Muskel nach SCHMIDT 2), während die entspr. älteren Angaben über Fehlen in z. B. Milz und Leber des Schweines (für Guanin, nicht Guanosin, *l. c. 195/6, 198, 214*) in Anbetracht des Vorkommens in Milz und Leber des Kaninchens etc. einer Nachprüfung bedürfen. Nach Angaben von MAKINO 9) scheint Guanase im Kaninchendarm zu fehlen, die Hydrolyse von Guanylsäure liefert intaktes Guanosin, während Adenosin desaminirt wird; ebenso fehlt sie im Pankreas des Rindes 9a).

Die Adenosin-aminasen kommen aber wohl in jeder tierischen Zelle vor, da sie wie gesagt, die Hauptwerkzeuge des Nucleinstoffwechsels sind, in Anbetracht der Tatsache, daß das Nucleotid des Ribodesoxy-adenins sehr wenig oder garnicht angegriffen wird (KLEIN 8, 8a)) (§ 435). Dies gilt für Leber, Darmschleimhaut etc., aber man kann es wohl verallgemeinern. Dies gilt auch für den Muskel, soweit eben der hier wenig umfangreiche Nucleinstoffwechsel in Frage kommt; auch der Skelettmuskel enthält eine Adenosin-aminase. Ihre Rolle wird hier aber dadurch in den Hintergrund gedrängt, daß im Skelettmuskel der ganz überwiegende Vorgang die Umsetzung der Ergadenylsäure ist, die grundsätzlich auf der Nucleotidstufe desaminirt wird. Für andere Organe gilt dies nicht so ausschließlich: bei ihnen wird auch die Ergadenylsäure z. T. erst zur Nucleosidstufe abgebaut und dann das Adenin-ribosid — wohl durch dieselbe Adenosin-aminase — desaminirt. Nach OSTERN 10) gilt dies beschränkt auch für den Herzmuskel; hier tritt neben die Desaminirung der Nucleotidstufe ebenfalls die des Nucleosids; das Verhältnis der beiden Vorgänge ist je nach der Tierart verschieden: bei den Warmblütern überwiegt die Adenosin-aminase, beim Frosch findet sich fast ausschließlich die Desaminirung des Nucleotids. (Näh. § 436.)

Besonders intensiv wirkt die Adenosin-desaminase der Darmschleimhaut; dies ist physiologisch wichtig, um die giftigen Adenylkörper vor der Resorption zu entgiften (KLEIN 8)).

8a) ***W. Klein, S. J. Thannhauser***, Ribodesose-adenylsäure. ibid., **224**, 252 (1934). S.A. — 9) ***K. Makino***, Ferm. Spalt. der Mononucleotide etc. Zs. phys. Chem., **225**, 151 (1934). S.A. — 9a) ***K. Makino***, Geb. und freie Purine in den Organen des Rindes. Jl. of Biochem., **22**, 97 (1935). S.A. — 10) ***P. Ostern, T. Mann***, Mechan. der Desamin. im Herzen. Bioch. Zs., **260**, 326 (1933).

Bei Wirbellosen (*Hirudo*, Muschel *Anodonta*) fand TRUSZKOWSKI 11) Guanase und Adenase, da Hypoxanthin und Xanthin Endprodukte des Stoffwechsels sind.

Über Schwankungen unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen ist noch so gut wie nichts bekannt. Einiges wenige über die Purinaminasen als Gesamtheit s. § 436. Entsprechend der Tatsache, daß der Purinumsatz mit dem Gehalt des Organismus an Vitamin A symbat geht (v. EULER 12)), haben die Organe (Milz) von Ratten bei A-Avitaminose einen deutlich verringerten Gehalt an Guanase, während Tumortiere einen hohen Gehalt aufweisen. Auch die Kinetik ändert sich: bei A-Mangel wird die normalerweise convexe Zeit-Umsatzkurve concav, nach Carotinzufuhr wieder convex (13).

2) Nucleotid-aminasen.

a) Darstellung und Eigenschaften.

§ 435. Die bereits lange vermutete volle Unabhängigkeit und Specifität der die Purinnucleotide bereits in diesem Stadium, also vor der hydrolytischen Abspaltung der Phosphorsäure, desaminirenden Fermente ist von EMBDEN und SCHMIDT 14, 15) gesichert, und dann von SCHMIDT 16) durch präparative Trennung der Enzyme endgiltig erwiesen worden. Es stellte sich dabei heraus, daß im Muskel eine ganz specifisch auf die Ergadenylsäure gerichtete Aminase vorhanden ist, die die Synadenylsäure nicht angreift, ebensowenig aber die Adenyl-pyro-phosphorsäure (S. 108); darauf kommen wir unten gesondert zurück. Guanylsäure-aminase fehlt im Muskel; sie ist aber in anderen Organen enthalten, von SCHMIDT 16) aus Leber dargestellt. Eine isolirte Darstellung ist aber nicht möglich, da sie bei der Trennung von der Guanase zwar adsorbirt, aber nicht wieder eluirt werden kann.

Guanylsäure-aminase. Den Nachweis, daß die NH_3-Abspaltung durch dieses Enzym tatsächlich im Nucleotid-stadium erfolgt, erbrachte SCHMIDT dadurch, daß er das Enzymgemisch bei einem so sauren ph wirken ließ, daß die Guanase sicher ausgeschaltet war.

Opt. ph 5,3—6,5. **NaF** hemmt — im Gegensatz zur Guanase — schon bei minimalen Konzz. (n/400).

An die Wirkung dieses Enzyms schließt sich noch eine interessante, aber nicht voll geklärte Frage. SCHMIDT hat mit Enzymgemisch aus Kaninchenleber gefunden, daß die nach der Desaminirung entstandene Xanthylsäure in der Art weiter zerfällt, daß die Bindung zwischen Xanthin und Zucker gelöst wird, also wie bei Nucleosiden, und Ribosephosphorsäure entsteht. LEVENE 17) hat dieses Ergebnis mit Schweineorganen nicht gefunden, wohl aber fand er eine erhebliche Instabilität der Xanthylsäure an sich bei ihrem eigenen ph, sie zerfällt bei 50° in 48 h in der angegebenen Weise, indem 40 % Ribose-PhS entstehen.

Die **Adenylsäure-aminase** führt die Adenylsäure, d. h. Adenin-ribosid-5-PhS

---

11) ***R. Truszkowski***, Purinolyt. enz. of ... Hirudo and Anodonta. Biochem. Jl., **22**, 1299 (1928). — 12) ***H. v. Euler, G. Schmidt***, Einfl. des Carotins auf den Puringehalt etc. Zs. phys. Chem., **223**, 215 (1934). — 13) ***J. Rydh-Ehrensvärd, G. Schmidt***, Einfl. des Carotins auf den Guanasegehalt etc. ibid., **227**, 177 (1934). — 14) ***G. Schmidt***, Ferm. Desamin. im Muskel. Zs. phys. Chem., **179**, 243 (1928). — 15) ***G. Embden, G. Schmidt***, Muskeladenylsäure und Hefenadenylsäure. Zs. phys. Chem., **181**, 130 (1929). — 16) ***G. Schmidt***, Ferm. Abbau der Guanylsäure in der Kaninchenleber. ibid., **208**, 185 (1932). — 17) ***P. A. Levene, A. Dmochowski***, Compar. rates of hydrol. of adenylic etc. acids. Jl. of Biol. Chem., **93**, 563 (1931).

(Ergadenylsäure) in Inosinsäure, d. h. Hypoxanthin-ribosid-5-PhS über, ist darauf völlig specifisch eingestellt, greift die 3-Phosphorsäure (Adenin-nucleotid, Synadenylsäure) nicht an (SCHMIDT **14)**, EMBDEN und SCHMIDT **15)**). Auch Ribodesose-Adenylsäure, das Abbauprodukt der Zoonucleinsäure, ist gegen Darmenzym resistent **(18)**). Im Muskel selbst ist also Ergadenylsäure die Quelle des NH_3; auch zugesetzte Adenylsäure wird in Inosinsäure übergeführt (EMBDEN **19)**).

Die **Darstellung** erfolgt aus Muskel (SCHMIDT). Waschen des Breis mit phys. NaCl-Lösung, Extraktion mit 2 % $NaHCO_3$. Bereits ziemlich reines Enzym, nur noch wenig Adenase, kein anderes Enzym. Adsorption an Tonerde $C\gamma$ läßt die Adenase zurück; Elution mit n/1 Na-Phosphat liefert wirkungsreines Enzym.

ph-Opt. = 5,7—6,15, steil abfallend. Bei 9,01—9,2 wird nach MANN **20)** die Wirkung völlig aufgehoben, aber nur bei Anwendung von Borat- oder Phosphat-puffern, bei anderen Puffern noch bei 9,2 etwas Wirkung. **Reaktions-Verlauf** innerhalb gewisser Substratkonzz. monomolecular (SCHMIDT).

Physiologisch von großer Bedeutung ist ferner die starke Hemmung durch **Phosphate**, die sicherlich zur Regulation der ungemein verwickelten gegenseitigen Beziehungen zwischen Purinstoffwechsel und Zuckerstoffwechsel im Muskel beiträgt. So einfach, wie sich MANN **21)** die Sache vorgestellt hat, daß nämlich die Hemmung weiter nichts ist als eine Synthese zu Adenyl-pyro-PhS durch die Phosphate selbst, liegt sie sicher nicht, sondern es gehen viel komplicirtere Reaktionen vor sich (s. u.); aber das Prinzip wird dadurch nicht berührt. Auch **Magnesium** hemmt das Enzym; OSTERN und MANN (l. c. 33) weisen darauf hin, daß hierin eine Erklärung für die Bedeutung des Mg als Bestandteil der Cozymase liegen könnte.

Specifität der Adenylsäure-aminase. Wie erwähnt, greift nach SCHMIDT und EMBDEN das Enzym nur Ergadenylsäure an, Synadenylsäure nicht, ebensowenig die Ribodesose-Adenylsäure (l. c. 8a, 18); auch die Hefen-cozymase, ein Derivat der Ergadenylsäure, wird nach MYRBÄCK **21a)** nicht angegriffen. Adenyl-pyro-PhS wird, aber sehr langsam, angegriffen, 20 mal langsamer als Ergadenylsäure (JACOBSEN **21b)**).

Gegen diese Feststellungen kann man eigentlich nur eine summarische Angabe von BUELL **22)** anführen, daß Muskel-extrakte von Mensch und Ratte Hefenadenylsäure im Sinne EMBDENS nicht desaminiren, während Extrakte von Schwein, Rind, Kaninchen Hefennucleinsäure bis zum Hypoxanthin zerlegen. Es kann sich hier ebenso wohl um eine stärkere Phosphatase und Desaminirung reichlicher gebildeten Adenosins handeln, wie um eine Abweichung von der von EMBDEN aufgestellten Regel. Eine vergleichende Untersuchung verschiedener Muskeln, parallel zu den angeblich verschieden stark wirksamen Nucleotidasen, ist noch nicht durchgeführt. SCHMIDT's Enzym stammte aus Kaninchen-Muskel. Beim Herzen findet in ganz verschiedenem Ausmaß die Reaktion bald am Nucleotid, bald am Adenosin statt (s. u.).

Noch weniger ist es bisher klar, ob andere Organfermente Synadenylsäure angreifen. Aus Versuchen von MAKINO **23)** über die Einwirkung von Darmferment auf die isolirten Nucleotide geht hervor, daß Guanosin und Inosin entstehen; Guanylsäure wird nicht desaminirt. Danach scheint hier eine Guanin-desaminirung auf beiden Stufen nicht einzutreten, während

---

18) ***W. Klein, S. J. Thannhauser,*** Pyrimidin-nucleotide aus Thymusnucl. Zs. phys. Chem., **231,** 95 (1935). S.A. — 19) ***G. Embden c. s.,*** Desaminirung der Adenylsäure durch Muskelbrei etc. ibid., **179,** 149, 161, 186, 226 (1928), **210,** 194 (1932). — 20) ***T. Mann, P. Ostern,*** Hemm. der Ammoniakbild. durch versch. alkal. Pufferlös. Bioch. Zs., **274,** 154 (1934). — 21) ***T. Mann,*** Mech. der Desamin. im Skelettmuskel. Bioch. Zs., **266,** 162 (1933). — 21a) ***K. Myrbäck, B. Örtenblad,*** Einwirk. der Adenyls.-desaminase auf Cozymase. Zs. phys. Chem., **234,** 254 (1935). S.A. — 21b) ***E. Jacobsen,*** Umsatz der Adenylpyrophosph. in vitro. Bioch. Zs., **257,** 221 (1933). — 22) ***M. V. Buell,*** Origin of inosinic acid. Amer. Jl. Phys., **90,** 302 (1929). — 23) ***K. Makino,*** Ferm. Spalt. der Mononucleotide etc. Zs. phys. Chem., **225,** 151 (1934). S.A.

Abgeschlossen: 14. 2. 36. Ber. Phys. 90, H. 1/2.

Adenin desaminirt wird, aber anscheinend auch erst auf der Adenosin-Stufe. Ebensowenig kann man etwas aus den Versuchen von GYÖRGY (l. c. 5) entnehmen, die nur zeigen, daß allerlei Organe (Schwein) Hefen-nucleinsäure desaminiren, aber nichts über den Weg aussagen.

Vorläufig kann man sich also die Sache so zurecht legen, daß im Sinne EMBDEN's bei der Ergadenylsäure die Desaminirung die schnellere Reaktion ist, so daß die (an sich durchaus mögliche, vgl. § 428) Abspaltung der PhS verdunkelt wird. Infolgedessen wird diese erst auf der Stufe Inosinsäure gespalten. Beim Muskel wird dieser Vorgang noch dadurch verstärkt, daß die Nucleotidase sehr schwach ist. Die Synadenylsäure wird andererseits wohl stets schneller gespalten als dephosphorylirt, so daß hier bei genuinen Enzymgemischen die Desaminirung grundsätzlich auf der Stufe Nucleosid erfolgt. Dasselbe gilt für die Ribodesoxy-adenylsäure.

b) Vorkommen und Bedeutung.

§ 436. Die Nucleotid-aminasen haben erstens natürlich ihre selbstverständliche Bedeutung als Werkzeuge des Kern-Stoffwechsels, indem sie den Abbau der Nucleine auf diesem Wege um eine Stufe weiterbringen. An den desaminirten Purinen setzen dann nach Hydrolyse die dehydrirenden Prozesse ein, die zu Harnsäure oder darüber hinaus führen. So sind denn diese Enzyme überall vorhanden, wenn auch ihre specielle Rolle gegenüber den zu demselben Ziele führenden Nucleosid-aminasen schwer abzuschätzen ist. Der Guanylkern wird anscheinend auf beiden Stufen desaminirt. der Adenylkern vorwiegend auf der Adenosinstufe **(8a)**. Im Einzelnen wissen wir von diesen Vorgängen wie überhaupt vom Stoffwechsel der Kern-nucleine, enzymtypisch betrachtet, noch sehr wenig. Eine starke Zunahme der Nucleotidase-Wirkung in der Leber scheint (auf grund der analytisch gemessenen Veränderungen) nach Adrenalin und P-Vergiftung zu erfolgen **(23a)**; nach Insulin erst bei der Autolyse.

Dem gegenüber tritt nun ein etwas abweichender Vorgang in allen untersuchten Organen, und ganz besonders im Muskel, deutlich hervor, nämlich die **Desaminirung der Ergadenylsäure**, der nicht aus den Chromatinen stammenden Adeninribosid-5-PhS. Diese Substanz findet sich anscheinend überall (wenn auch wohl hauptsächlich als Adenylpyro-PhS, S. 108) und ist die eine Quelle des in allen Geweben auftretenden Ammoniaks; resp. bei allen Organen außer Leber und Niere, in denen die Desaminirung der Aminosäuren vorherrscht (s. u.), die wichtigste Quelle. Natürlich liefern auch die anderen Abbaustufen der Nucleine NH_3, aber deren Anteil ist gering (vgl. z. B. MAKINO, l. c. 43a). Die Adenylsäure selbst ist ebenso wichtig im Stoffwechsel — als Kreislaufhormon, s. b. WERLE 24) —, wie das daraus entstehende Ammoniak, das für die verschiedensten Zwecke gebraucht werden kann: ph-Regelung, Elektrolytaustausch (speziell in der Niere), Aufbau von Aminosäuren (zum mindesten von Glycin) und Amiden (Glutamin) etc. So ist die Bildung dieses Specialnucleotids und seine Desaminirung eine der wichtigsten Erscheinungen im intermediären Stickstoffwechsel. Wir können das hier natürlich nicht näher erörtern, vielmehr nur auf einige enzymtypisch wesentliche Punkte hinweisen.

Nucleotid-aminasen im Muskel. Hier liegen insofern besondere Verhältnisse vor, als hier dieser eben erwähnte Vorgang, die Desaminirung der Ergadenylsäure, nicht nur quantitativ das Feld beherrscht, sondern außerdem noch die Abspaltung

---

23a) ***G. dell Acqua,*** Gehalt der Kaninchenleber an Nucl. etc. Bioch. Zs., **279**, 403 (1935). — 24) ***E. Werle,*** Körpereigne kreislaufaktive Stoffe. Hb. der Biochem., Erg. Werk Bd. III, S. 1100. Jena 1935.

und Wiederanlagerung von NH_3 in direkten und wesenswichtigen Beziehungen zum gesamten Stoffwechsel steht (s. u.). Quantitativ steht sie deswegen im Vordergrund, weil das NH_3 ganz überwiegend aus dieser Quelle fließt: die aus dem Kern-nuclein stammende Adenylsäure wird von dem Muskelferment nicht angegriffen, und Guaninkerne sind nur in sehr geringer Menge vorhanden. Die Ergadenylsäure spielt im Muskel eine gewichtige Doppelrolle, einerseits als Muttersubstanz der Adenyl-pyro-PhS und damit der Cozymase, und zweitens eben als Quelle des NH_3. Auf die erste Bedeutung haben wir hier nicht einzugehen, s. S. 108 und bei LOHMANN **25)**.

Die starke und sehr schnelle („traumatische") NH_3-Bildung in zerriebenen Muskeln wurde von PARNAS **26)** entdeckt und genauer untersucht. Etwa gleichzeitig mit EMBDEN (SCHMIDT, l. c. 14, EMBDEN c. s., l. c. 15, 19) kam dann auch PARNAS **27, 28)** zu der Erkenntnis der Muskel-Adenylsäure als Quelle des NH_3. Dieser Vorgang ist tatsächlich praktisch der einzige enzymatische Prozess an den Nucleinen überhaupt im Skelett-Muskel, wenn wir von dem ganz anders gearteten Aufbau und Abbau der Adenyl-pyro-PhS absehen. Denn wie aus den Angaben der Schulen EMBDEN und PARNAS (s. z. B. OSTERN **29)**) hervorgeht, findet eine hydrolytische Spaltung der Ergadenylsäure kaum statt, sondern praktisch nur ihre Desaminirung (vgl. § 428); und die Prozesse am Guaninkern treten ganz in den Hintergrund. Ungefähr ebenso verhält es sich im Herzen **(30, 31)**; jedoch ist hier auch eine Spaltung von Ergadenylsäure nachweisbar (§ 428) (REIS **32)**); und demgemäß findet hier eine schnellere Desaminirung des Adenosins als der Adenylsäure statt (Säugetiere und Vögel, bei Ratte und Schildkröte gleich schnell; nur beim Frosch ganz überwiegend der Adenylsäure **(33)**). Beim Herzen liegen die Verhältnisse schon deswegen anders, weil hier nicht die Pyrophosphorsäure, sondern eine Di-phosphorsäure des Adenins dominirt (LOHMANN). Wir können darauf nicht näher eingehen. Die Desaminirung von Synadenylsäure im Herzen verläuft demgemäß nur über die Adenosinstufe **(33)**.

Dieser Vorgang ist in irgend einer Form umkehrbar, d. h. die Inosinsäure kann wieder zu Ergadenylsäure werden; wie, ist noch strittig, ob durch einfache Reversibilität des Vorganges an sich, wie EMBDEN annimmt, oder durch Anlagerung von in der aeroben Erholung aus anderer Quelle neu entstandenem NH_3 nach PARNAS; dies kann hier nicht erörtert werden. Ebensowenig können wir auf die höchst verwickelten Reaktionsabläufe eingehen, die unter Einbeziehung der Phosphorsäure vor sich gehen. Phosphate hemmen wie erwähnt die Aminase vollständig; nach PARNAS **34)** ist die „traumatische" Entbindung von NH_3 nichts anderes als eine Ausschaltung dieser Phosphathemmung durch Verdünnen. Im intakten Muskel gibt es für die Adenylsäure zwei Wege: entweder wird sie desaminirt (und wie oben gesagt wieder aminirt) oder sie wird phosphorylirt, d. h. aufgebaut zu Adenyl-pyro-PhS als der eigentlichen Muskelsubstanz (s. u.), wobei höchst komplicirte Übertragungen der PhS über die Zuckerphosphate und Phosphagene verlaufen, die wir S. 110 kurz angedeutet haben, und die hier nicht weiter zu erörtern sind. Ebensowenig können wir auf die an sich überaus wichtige Frage hier eingehen, ob diese Desaminirungsreaktion die unmittelbare Ursache der Kontraktion ist, wie EMBDEN vertritt, dagegen PARNAS und LOHMANN **25)** bestreiten. Die Sache ist nicht entschieden, wir können nur einige direkt enzymtypische Probleme hier streifen.

---

25) ***K. Lohmann,*** Stoffw. des Muskels. Hb. der Biochem., Erg. Werk, Bd. III. Jena 1935. — 26) ***J. K. Parnas c. s.,*** Ammoniakbildung im Muskel etc. Bioch. Zs., **184**, 399, **188**, 15, **190**, 388 (1927). — 27) ***J. K. Parnas,*** Purinstoffw. des Muskels etc. Klin. Ws., **1928**, II, 1423, 2011. — 28) ***Ders.,*** Ammoniakbild. im Muskel VI. Bioch. Zs., **206**, 16 (1929). — 29) ***P. Ostern,*** Purinkörper des Kaninchenmuskels. Bioch. Zs., **221**, 64 (1932). — 30) ***P. Ostern,*** Ammoniakbild. im Froschherz. Bioch. Zs., **228**, 401 (1930). — 31) ***J. K. Parnas, P. Ostern,*** Ammoniakbild. im isol. Froschherz. ibid., **234**, 307 (1931). — 32) ***J. Reis,*** Nucléotidase etc. Bull. Soc. Chim. Biol., **16**, 385 (1934). — 33) ***P. Ostern, T. Mann,*** Mechan. der Desamin. im Herzen etc. Bioch. Zs., **260**, 326 (1933). — 34) ***J. K. Parnas, P. Ostern, T. Mann,*** Verkett. der chem. Vorg. im Muskel. Bioch. Zs., **272**, 64 (1934), **276**, 398 (1935).

Nach LOHMANN 35) ist die Desaminirung für die Kontraktion an sich schon deshalb entbehrlich, weil das Enzym im Muskel der Crustaceen überhaupt fehlt. Es fehlt aber auch im Augenblick der Kontraktion das Substrat: nach PARNAS wie LOHMANN gibt es im frischen Muskel keine Adenylsäure, sondern nur Adenyl-pyro-PhS, resp. Adenosin-di-PhS (DOTZENRODT, § 427, l. c. 38), und diese ist, wie S. 110 angegeben, der enzymatischen Desaminirung unzugänglich, nur durch HNO_2 zu desaminiren (s. aber l.c. 21b). Die aus Muskel dargestellte Ergadenylsäure ist ein Kunstprodukt, entstanden durch die alkalische Aufarbeitung. Dementsprechend gibt ganz frischer enteiweißter Muskel, in dem die Pyrophosphatase noch nicht hat wirken können, mit Adenylsäure-aminase kein NH_3 ab (36), was PARNAS 38) bestätigt hat. Die Desaminirung in vivo kann also erst nach der Umsetzung der Adenyl-pyro-PhS erfolgen, also nicht unmittelbar zur Kontraktion führen.

Jedenfalls ist dieser Vorgang, Adenylsäure ——▶ Inosinsäure + NH_3, einer der für den Muskelstoffwechsel charakteristischen Vorgänge. Die Inosinsäure wird dann erst hydrolytisch weiter zerlegt, wobei noch verschiedene Unklarheiten obwalten, ebenso über die Frage, was denn im eigentlichen Nucleinstoffwechsel des Skelettmuskels mit dem Adenin-nucleotid (der 3-PhS) geschieht, wenn dieses gegen die Aminase resistent ist, andererseits eine darauf wirksame Phosphatase auch „fehlen" soll (§ 428). Wahrscheinlich genügt bei der relativen Geringfügigkeit des Nucleinstoffwechsels im Muskel die Phosphatase doch, so daß wir vorläufig annehmen wollen, daß das Adenin-nucleotid auf dem Wege über primäre hydrolytische Spaltung ohne Desaminirung erst in Adenin-desosid übergeführt und dann desaminirt wird, durch die Adenosin-aminase des Muskels.

Für das Guanin-nucleotid, das ja stets dem eigentlichen Nucleinstoffwechsel angehört, müssen wir wohl im Muskel den regelmäßigen Weg über Desaminirung zu Xanthylsäure, freiwillige Abstoßung der Purine etc. annehmen, da nach SCHMIDT (l. c. 14) der Muskel die Desaminirung von Guanin mangels einer Guanase nicht vornehmen kann. Eine volle Klärung liegt insofern noch nicht vor, als auch hier die Desaminirungsfrage bei den Ribodesoxy-Nucleotiden der Thymonucleinsäure noch nicht durchgeprüft ist; vielleicht existirt doch eine spezifische Nucleotid-aminase für das Ribodesoxy-nucleotid des Guanins. Weiterhin gibt zu denken, daß nach EMBDEN (l. c. 19) wie nach PARNAS 28) das NH_3, das im Muskel frei wird, ausschließlich aus der Adenylsäure stammt, so daß man auch danach nicht recht weiß, was denn mit dem Guanin-nucleotid geschieht, resp. wo dessen Aminogruppe bleibt. Wahrscheinlich liegen alle diese Unsicherheiten darin begründet, daß im Muskel überaus geringe Mengen der Guaningruppe vorkommen, die bei der schwierigen quantitativen Aufarbeitung verschwinden können. So fand z. B. PARNAS nur etwa 1,5 % des Purin-N als Guanin; ebenso OSTERN 29) nur Spuren, und POHLE 39) so winzige Menge Xanthin, daß er sie auf sekundäre Oxydation von Hypoxanthin zurückführt. Auch für die — an sich kleine — Fraction „Nucleinsäure" gibt die Schule PARNAS auffallend geringe Guaninzahlen an (Tabelle bei BARRENSCHEEN 40)), so daß man auf die Vermutung kommen kann, daß das — noch nicht untersuchte — Nuclein des Muskels ärmer an Guaningruppen ist.

Niere. Da sich nach EMBDEN 41) auch hier dieselbe Adenylsäure findet wie im Muskel, wird man auch das gleiche specifische Ferment dort annehmen können; ein direkter Nachweis liegt m. W. nicht vor. Nur GYÖRGY 42) schließt aus dem Verhalten von Nierengewebe gegen

35) ***K. Lohmann***, Umsatz von Phosphors.-Verb. in Organen (Vortrag). Ang. Chem., **1935**, 165. — 36) ***K. Lohmann, Ph. Schuster***, Vork. der Adenin-nucleotide in den Geweben. Bioch. Zs., **272**, 24 (1934). — 38) ***J. K. Parnas, C. Lutwak-Mann***, Ammoniakgeh. etc. im Muskel. Bioch. Zs., **278**, 11 (1935). — 39) ***K. Pohle***, Tiefe ferm. Spaltprod. der Muskeladenylsäure. Zs. phys. Chem., **185**, 9 (1929). — 40) ***H. K. Barrenscheen***, Purinkörper des Muskels. Hb. der Biochem., Erg. Werk, Bd. II, S. 232, Jena 1934. — 41) ***G. Embden, H. J. Deuticke***, Isol. von Muskeladenyls. aus der Niere. Zs. phys. Chem., **190**, 62 (1930). — 42) ***P. György, W. Keller***, Topographie des Nierenstoffw. Bioch. Zs., **235**, 86 (1931).

Adenylsäure indirect auf ein solches Ferment, das im Papillengewebe stärker vertreten ist als in der Rinde. Die Hauptbildungsstätte des NH_3 in der Niere ist aber dem entgegen das Rindengebiet, so daß hier andere Prozesse stattfinden müssen (wahrscheinlich die von KREBS aufgefundene Desaminirung von Aminosäuren). Nach v. LEÖVEY **43)** ist diese Aminase hauptsächlich im Epithel der Tubuli contorti, wenig der Tubuli recti enthalten; eine Untersuchung, woher das NH_3 stammt, hat er nicht angestellt; es wird sich aber wohl wie bei GYÖRGY um die Desaminirung von Aminosäuren handeln. Auch WASSERMEYER **43a)** findet neben dem N aus Adenylsäure noch weitere Abgaben, besonders nach einiger Zeit (2—3 h). Nach MAKINO **43a)** beträgt der Anteil des NH_3 aus der Adenylsäure 38 % des gesamten NH_3. — In der **Leber** sind es unter 30 %. In beiden Organen ließ sich nach MAKINO nachweisen, daß auch die eigentlichen Nucleinabbaustoffe und auch Hefennucl. zur NH_3-Bildung beitragen. — In anderen Organen (Blut, Speicheldrüsen, Magen, Milz, Lunge) liegen die Verhältnisse ähnlich **(43a)**.

Retina: Die Netzhaut hat nach RÖSCH **44)** eine starke NH_3-Abspaltung bei Belichtung. Sie spaltet aus zugesetzter Adenylsäure reichlich (40—90 %) NH_3 ab, enthält also die Aminase. Umgekehrt spaltet aber SCHMIDT'sches Enzym aus abgetöteter Retina kein NH_3 ab. Die Quelle des NH_3 bleibt also unbekannt (vielleicht handelt es sich hier auch um nicht veränderte Adenyl-pyro-PhS im Sinne LOHMANN's beim Muskel, l. c. 25).

Embryonen im Ei des Riesensalamanders geringe Nucleasewirkung **(44a)**.

Pflanzen. Nach JONO **45)** scheinen in Preßsaften von Pflanzen (Sojabohne, Spinat) Aminasen zu fehlen. Er erhielt aus Phytonucleinsäure Guanosin, Adenosin und Cytosin. Auch in Hymenomyceten sehr schwache und wechselnde Desaminirung (MELIN **46)**); dagegen ist in Hefen nach HAEHN **47)** das Desaminirungssystem vorhanden; auch *Bacillus proteus* desaminirt sowohl die Purine wie Cytosin **(45)**.

3) Pyrimidin-aminasen.

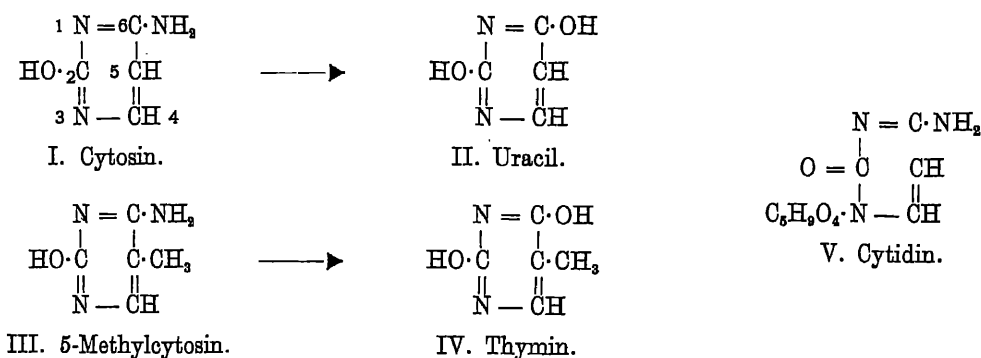
§ 437. Hier handelt es sich nur um Cytosin und seine Derivate, Cytidin und Cytidylsäure, die in die entsprechenden Uracil-derivate Uridin resp. Uridylsäure übergehen. Thymin kommt als Objekt der Desaminirung nicht in Betracht; eher könnte man annehmen, daß es bereits ein physiologisches Desaminirungsprodukt ist, nämlich des 5-Methyl-cytosins, das anscheinend auch gebunden vorkommt, nämlich in der Nucleinsäure der Tuberkelbazillen (§ 427, l. c. 73). Tatsächlich wird 5-Methylcytosin durch Hefenextrakt zu Thymin desaminirt (HAHN **48—50)**). Zur besseren Übersicht seien die Formeln wiedergegeben; und zwar die Enolformeln, bei denen die Desaminirung leichter ersichtlich ist. In den Nucleosiden sitzt der Zucker an 3; diese muß man also mit der Keto-imidformel schreiben (V).

---

43) ***Fr. v. Leövey,*** Lokalis. der Nierendesamidase. Bioch. Zs., **276**, 265 (1935). — 43a) ***H. Wassermeyer,*** Ammoniakbild. der Niere. Arch. für exp. Path., **165**, 420 (1932). — 43a) ***K. Makino,*** Bez. des Gewebeammon. zum Nucl.-Stoffw. Jl. of Biochem., **22**, 109 (1935). S.A. — 44) ***H. Rösch, W. te Kamp,*** Ammon.-Bild. bei der Belicht. der Netzhaut. Zs. phys. Chem., **175**, 158 (1928). — 44a) ***J. Takahashi,*** Embryoch. der Amphibien (Nuclease). Jl. of Biochem., **22**, 45 (1935); BPh **89**, 520. — 45) ***Y. Jono,*** Stud. über die Nucleinsäure. Act. Scholae Med. Kyoto, **13**, 176, 182 (1930). S.A. — 46) ***E. Melin, K. Helleberg,*** Aktivit. von Enz. . . . bei Hymenomyc. Bioch. Zs., **157**, 146 (1925). — 47) ***H. Haehn, H. Leopold,*** Spalt. der Nucleinsäuren bei der Hefenautol. Fermentforsch., **14**, 539 (1935). S.A. — 48) ***A. Hahn, L. Schäfer,*** Einw. von B. coli auf . . . Cytosin. Zs. Biol., **83**, 51 (1925). — 49) ***A. Hahn, W. Haarmann,*** Einw. von Hefenextr. auf Aminopyrimidine. Zs. Biol., **85**, 275 (1926). — 50) ***A. Hahn,*** Unt. über physiol. wicht. Pyrimidinderiv. Sitzber. Ges. Morph. München, **37**, 1 (1927); BPh **41**, 125.

```
1 N =6C·NH2                    N = C·OH
  |    |                        |    |
HO·2C  5 CH        ——→      HO·C    CH
  ||   ||                       ||   ||
3 N — CH 4                      N — CH
I. Cytosin.                 II. Uracil.

  N = C·NH2                    N = C·OH
  |    |                        |    |
HO·C   C·CH3       ——→      HO·C    C·CH3
  ||   ||                       ||   ||
  N — CH                        N — CH
III. 5-Methylcytosin.       IV. Thymin.

            N = C·NH2
            |
        O = C    CH
            |    ||
C5H9O4·N — CH
     V. Cytidin.
```

Enzymtypisch ähnelt Cytosin dem Adenin wegen der Stellung der Aminogruppe in C_6. Diese sitzt im Gegensatz zu der des Guanins in C_2 bei den freien Basen sehr fest; ebenso wie Adenin ist Cytosin an sich (außer durch Hefen und Bakterien, HAHN 48, 49)) überhaupt nicht enzymatisch zu desaminiren, wie zuerst HAHN 50), dann z. B. SCHMIDT (l. c. 14) am Muskel festgestellt haben.

Nur in glykosidischer Bindung ist es den Enzymen zugänglich, aber auch nicht immer. Aus dem Verhalten seiner verschiedenen Derivate geht hervor, daß es verschiedene Cytosin-aminasen gibt, die wahrscheinlich alle pyrimidin-specifisch sind. Eine klare präparative Trennung liegt noch nicht vor. Die einzige Angabe finde ich bei SCHMIDT (l. c. 16), daß bei der adsorptiven Trennung von Adenosinase und Nucleotidaminasen die Cytidin-aminase „meist" mit letzteren an das Adsorbens geht, sich also von der Adenosinaminase trennen, aber aus dem Adsorbat bisher nicht wiedergewinnen läßt.

Die Pyrimidin-aminasen sind anscheinend streng specifisch. So zeigten BIELSCHOWSKI c. s. 51—53), daß Cytosin-ribosid von den Enzymen von Leber und Darmschleimhaut desaminirt wird (zu Uridin), während Cytosin-ribodesosid von Darmferment überhaupt nicht angegriffen wird. Cytidin soll durch Leberferment sogar schneller als Guanosin desaminirt werden; es entspricht dies wieder dem Adenin, dem also Cytosin ebenso folgt, wie bei der Resistenz der freien Base; dasselbe fand MAKINO 54) für Nierenferment. — Wie nun das Cytosin-ribodesosid weiter abgebaut wird, ist vorläufig vollkommen unklar, vielleicht ist ein specifisches Enzym vorhanden, das bei der Aufarbeitung zerstört wird.

Eine direkte Desaminirung der Cytidylsäure zu Uridylsäure durch Darmferment bei gehemmter Nucleotidase hat MAKINO 55) gefunden. Im Gegensatz zur Nucleotidase wird diese Desaminirung nicht durch Phosphat gehemmt. Da es nun eine direkte Desaminirung der 3-Adenylsäure nicht zu geben scheint, so darf man wohl eine specifische Cytidylsäure-aminase annehmen.

II. Arginase.

§ 438 (*H. W.* § *446*). Dieses in seiner fast absoluten Specifität auf Arginin gerichtete Enzym hat in neuerer Zeit in drei Richtungen besonderes Interesse gefunden,

---

51) ***Fr. Bielschowski,*** Ferm. Aufspalt. der Hefennucl. mit Lebernucleotidase. Zs. phys. Chem., 190, 15 (1930). — 52) ***Fr. Bielschowski, W. Klein,*** Ferm. Aufspalt. der Thymonucl. etc. Zs. phys. Chem., 207, 202 (1932). S.A. — 53) ***Fr. Bielschowski, F. Klemperer,*** Ferm. Aufspalt. der Hefennucl. etc. ibid., 211, 69 (1932). — 54) ***K. Makino,*** Abbau der Nucleins. mit . . . Rinderniere. Zs. phys. Chem., 232, 196 (1935). S.A. — 55) ***K. Makino,*** Aufspalt. des Polynucl. . . . mit Darmenzym. Zs. phys. Chem., 225, 154 (1934). S.A.

einmal durch seine eigenartigen Aktivirungs- und Hemmungserscheinungen, die für die Theorie der Enzymwirkungen ganz allgemein von Bedeutung sind. Weiterhin durch seine offenbaren Beziehungen zu den Erscheinungen des Wachstums durch Zellteilung, dh. dem Stoffwechsel der Zellkerne (**56**). Dazu kommt aber noch seine von KREBS betonte Eigenschaft als Katalysator des Eiweiß-endstoffwechsels der Säugetiere, nämlich der Harnstoff-synthese, die sich grundsätzlich über Arginin als Zwischenstufe vollzieht.

1) Darstellung und Eigenschaften.

Methodisches über Darstellung und Bestimmung bei EDLBACHER H.W. Bd. III, S. 943. Herstellung wirksamer Präparate aus Kalbsleber durch Auspressen mit Kieselgur bei 300 at und Fällung mit Aceton. Extraktion mit Glycerol (HUNTER **65**)). Nach Acetontrocknung des Organs ist das Enzym unlöslich in Glycerol, aber extrahirbar bei ph > 6,4 (**61**)). Eine Reinigung bis zu einer etwa 30 fachen Wirkungssteigerung gelang EDLBACHER **59**): Voradsorption mit Tonerde, dann Kaolin, Elution bei ph = 9, Acetonfällung. Dipeptidase kann durch Adsorption an Tonerde $C\gamma$ entfernt werden (**60**). Das so erhaltene Enzym gibt kaum noch Proteinreaktionen; es enthält keine Histidase, auch keine Protease oder Histozym.

Arginase ist in der Hauptsache ein Endo-enzym (**63**); sie wird aber durch Autolyse leicht frei und diffundirt auch aus Gewebs-schnitten allmählich heraus; sie ist also kein Desmo-enzym.

Bestimmungsmethoden. Grundsätzlich bestimmt man entweder den entstehenden Harnstoff mit Urease (Titration des übergehenden NH_3, EDLBACHER **57**, **58**)) oder das nicht zerlegte Arginin, meist als Salz der Flaviansäure (**62**). Verfahren der Messung der Reaktionsänderung bei der Zerlegung des Harnstoffs durch geeignete Indikatoren HUNTER **66**). Auf ähnlichem Wege nutzt LINDERSTRØM-LANG **66a**) die Zunahme der Acidität aus, die bei der Spaltung des stark basischen Arginins zum schwach basischen Ornithin auftritt: Titration nach Zusatz von viel Alkohol-Aceton mit Thymolblau. Bei reichlicher Anwesenheit von Urease Methode nicht anwendbar. Kolorimetrische Messung mit der Reaktion auf Arginin nach SAKAGUCHI POLLER **67**) und KLEIN **68/9**). Bei Versuchen mit Ascorbinsäure + Cu (l. c. 102) ist die Urease-methode nicht anwendbar, da Urease dadurch total gehemmt wird.

Mikromethode (0.003 mg Harnstoff) durch Bestimmung des bei der Urease-wirkung gebildeten CO_2 manometrisch im WARBURG-Apparat WEIL **70**), nachdem bereits KREBS

---

56) ***S. Edlbacher***, Arginase und Histidase. Hb. der Biochem., Erg. Werk Bd. I, S. 468. Jena 1933. — 57) ***S. Edlbacher, P. Bonem***, Arginase. Zs. phys. Chem., **145**, 69 (1925). S.A. — 58) ***S. Edlbacher, H. Röthler***, Arginase. Zs. phys. Chem., **148**, 264 (1925). S.A. — 59) ***S. Edlbacher, E. Simons***, [H+] und Rein. der Arginase. Zs. phys. Chem., **167**, 76 (1927). — 60) ***S. Edlbacher, H. Burchard***, Arginasewirkung. ibid. **194**, 69 (1931). S.A. — 61) ***S. Edlbacher, J. Kraus, G. Walter***, Arginase VII. ibid., **206**, 65 (1932). S.A. — 62) ***S. Edlbacher, J. Kraus, F. Leuthardt***, Steu. der Argin.-Wirk. durch Sauerstoff. ibid., **217**, 89 (1933). S.A. — 63) ***F. Leuthardt, F. Koller***, Aktiv. der Arginase. Helv. Chim. Acta, **17**, 1030 (1934). S.A. — 64) ***S. Edlbacher, F. Koller***, Stoffw. der Tumoren. Zs. phys. Chem., **227**, 99 (1934). S.A. — 65) ***A. Hunter, J. A. Dauphinee***, Arginase meth. for the determ. of arginine etc. Jl. of Biol. Chem., **85**, 627 (1930). — 66) ***A. Hunter, J. A. Dauphinee***, Approx. color. meth. for the determ. of urea etc. Proc. Roy. Soc., **B 97**, 209 (1924). — 66a) ***K. Linderstrøm-Lang, L. Weil, H. Holter***, Mikrometh. zur Best. der Arginase. Zs. phys. Chem., **233**, 174 (1935). — 67) ***K. Poller***, Unt. über Arginase mit Hilfe der Sakaguchi-Reaktion. Zs. Biol., **86**, 309 (1927). — 68) ***G. Klein, W. Ziese***, Arginase u. Arginin im Stoffw. der Tumoren. Zs. Krebsf., **37**, 323 (1932). — 69) ***G. Klein, K. Tauböck***, Argininstoffw. und Harnstoffgenese. Bioch. Zs., **251**, 10 (1932). — 70) ***L. Weil, M. A. Russell***, Manom. micrometh. for arginase determ. Jl. of Biol. Chem., **106**, 505 (1934).

(l. c. 84) die WARBURG-Apparatur verwendet hatte. Methode zur Bestimmung von Arginin in Proteinen HUNTER **65**).

Opt. ph = 9,0 — 9,5 (**57**) auch für das gereinigte Enzym (**59**); resp. 9,8 (HUNTER **71**)).

Ältere Angaben von HINO **72**) sind nicht zutreffend (ph = 7,4). Diese Angabe ist schon deswegen unwahrscheinlich, weil er selbst angibt, daß A. bei diesem ph in 1 h bei 50° schon um 32 % geschwächt wird. 70° vernichtet vollkommen. Dagegen stimmt die Angabe HINO's für Tumor-arginase (EDLBACHER **62**)), aber nur für die A. in der Necrose und bei Anwesenheit von Sauerstoff (ph = ca. 7); bei Abschluß von Sauerstoff hat auch sie denselben ph von 9,2 wie die Leberarginase (**64**). Im übrigen hängt der opt. ph von der Dauer des Versuches ab (**63, 64**); bei der Labilität des Enzyms zeigt der sog. opt. ph viel eher ein Minimum der Schädigung als ein Maximum der Wirkung des als intakt anzusehenden Enzyms an. Die Zerstörung beginnt schon > 8, bei < 4 und > 12 sehr schnelle Zerstörung. Stabilitätsoptimum 6,6—7,8 (HUNTER **71**)).

Temperaturkoefficient nach HUNTER **83**) bei ph = 7.35 von 0—30° Q_{10} = 2,7—2,19, 30—50° 1,74—1,54 wegen Hitze-inaktivirung. Bei ph = 9,85 Q_{10} schon bei 0—10° 2,34, 10—20° 1,99. Bei 40° schon schnelle Zerstörung. Aktivirungsenergien (ph = 7,35) 0—10° 15200, 40—50° 8660; (ph = 9,85) 0—10° 13000, 20—30° 9600 cal.

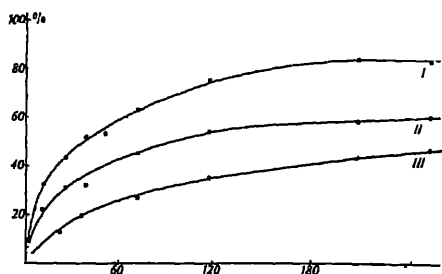



Abb. 56. Abhängigkeit der Arginasewirkung von der Fermentkonzentration nach (**68**)

Extrakt aus Schweineleber-Trockenpulver. 1 g Trockenpulver mit 50 cm³ Glykokollpuffer 15 Minuten leicht geschüttelt und zentrifugirt. Kurve I: 20 cm³ Extrakt; Kurve II: 10 cm³; Kurve III: 5 cm³, überall + 30 cm³ 0,1-m. Argininlösung von p_H 9,3 + Glykokollpuffer ad 100 cm³.

Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: Prozent Spaltung.

Kinetik. Die Wirkung ist niemals vollständig, im Höchstfall 95 % (*vgl. l. c. 154*). Die Wirkungszunahme mit der Enzymmenge steigt zunächst steil an, die Kurve wird dann flacher; nur bei Enzym aus Hühnerniere ist sie stets eine Grade (**58**). Bei Schweineleber ähnelt die Kurve einer nach der SCHÜTZ'schen Regel (Abb. 56).

Die Zeitumsatz-Kurve folgt nicht dem Gesetz der monomol. R., die Konstante sinkt vielmehr dauernd ab (**60, 63**) und zwar wegen Inaktivirung des Enzyms.

Einheiten: nach EDLBACHER **58**) A.E. = Menge A., die aus 10 ccm einer mit 5 ccm Puffer (Glycin-NaOH, 9,5) versetzten 1 % Argininlösung in 60′ bei 38° soviel Harnstoff liefert, daß bei der Zersetzung 0,34 mg NH_3 entstehen (1 ccm n/50 H_2SO_4). Arginasewert Zahl der A.E. in 1 g Präparat oder Organ. — Etwas andere Einheit HUNTER **66**).

Die **Specifität** ist überaus scharf. FELIX **73—76**) hat eine große Anzahl von Stoffen auf Spaltbarkeit geprüft. Es sind spaltbar nur d-Arginin und d-α-Monobenzoylarginin; alle übrigen Stoffe nicht, womit einige ältere Angaben im H. W. widerlegt werden. Die Specifität richtet sich anscheinend wie bei den Carboxy-polypeptidasen auf das Carboxyl, nicht auf die freie Aminogruppe; denn Argininsäure ist spaltbar, der Methylester des Arginins nicht (CALVERY **77**)). Bei der Leberdurchströmung wird

71) ***A. Hunter, J. A. Morell*** (***J. A. Dauphinee***), Arginase I, II, Quart. Jl. Exp. Phys., **23**, 89, 119 (1933); BPh **77**, 515. — 72) ***S. Hino***, Beeinfl. der Leberarginase d. äußere Faktoren. Jl. of Biochem., **6**, 335 (1926). — 73) ***K. Felix, K. Morinaka***, Argininstoffwechsel. Zs. phys. Chem., **132**, 152 (1923). — 74) ***K. Felix, H. Müller***, Desamidir. des Arginins. Zs. phys. Chem., **174**, 112 (1928). — 75) ***K. Felix, H. Müller, K. Dirr***, Argininstoffw. II. Zs. phys. Chem., **178**, 192 (1928). S.A. — 76) ***K. Felix, K. Dirr, A. Hoff***, Clupein VI. Zs. phys. Chem., **212**, 50 (1932). — 77) ***H. O. Calvery, W. D. Block***, Specif. of . . . arginase. Jl. of Biol. Chem., **107**, 155 (1934).

auch d-l-Arginin total gespalten (FELIX 73)); ebenso durch Bakterien (§ 439).

Nicht spaltbar z. B. Nitro-, Methyl-, Dibenzoylarginin, Agmatin, (in Bestätigung von l. c. 57) Guanidin-essig-, -butter- und capronsäure (75), bestätigt STEIB 78); s. a. l. c. 114). Neben Agmatin fand KOLLER 67) auch Galegin unspaltbar. Bzgl. d-Argininsäure (an der α-Aminosäure desaminirtes Arginin, FELIX 74)) fand CALVERY 77) bei langer Einwirkung 80 % Spaltung. Arcain (Tetramethylen-guanidin) aus Muscheln ist unspaltbar (79).

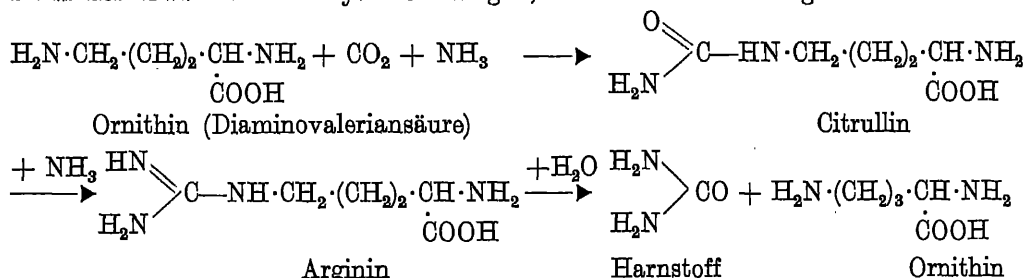
Das sog. „Dipeptid" Arginyl-arginin nach EMIL FISCHER ist von FELIX (*l. c. 146*) als unspaltbar befunden worden; es ist aber kein echtes Dipeptid, sondern ein α, δ-Bisguanido-n-valeriansäure-anhydrid (80); das aus Clupein darstellbare wahre Dipeptid (KOSSEL 81)) wird nach EDLBACHER 60) von reiner Arginase nur so angegriffen, daß ein Guanidinkern gespalten wird, und zwar der an dem Arginin, das die freie Carboxylgruppe trägt; die Peptidbindung bleibt intakt, wird aber von roher Arginase gespalten, weil diese eine Peptidase enthält. Es wird aber ebenso auch Clupein selbst angegriffen, da hier ein Mol. Arginin endständig ist; dies wird gespalten und die entspr. Menge Harnstoff frei (FELIX 76)). Nach HUNTER 82) kann man durch eine Kombination von Tryptase und A. auch aus anderen Proteinen Harnstoff abspalten (Caseinogen, Gelatine, Edestin, Eialbumin, auch WITTE-Pepton). Nur aus den beiden ersten wird die Hälfte des Arginins gespalten.

$$\begin{array}{l} CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH \left\langle \begin{array}{l} CH \text{———————} CO \\ NH - C(:NH) - NH \end{array} \right. \\ HN - C(:NH) \cdot NH_2 \end{array}$$

Die Wirkung der Arginase ist wie längst bekannt eine Aufspaltung des Arginins in der Art, daß aus dem Guanidinkern des Arginins unter Sprengung der C—N Bindung Harnstoff in toto abgespalten wird, so daß Ornithin verbleibt.

Das von der unten zu besprechenden KREBS'schen Theorie (84) als Zwischenprodukt des Aufbaus geforderte **Citrullin** (δ-Carbaminyl-ornithin, WADA 85)) soll nach der Theorie nicht als Zwischenprodukt des enzymatischen Abbaus auftreten. Der katalytische Kreislauf ist vielmehr so gerichtet, daß sich an das Ornithin je 1 Mol CO_2 + NH_3 zu Citrullin anlagert, das durch ein weiteres NH_3 zu Arginin wird; aber die desaminirende Hydrolyse erfolgt dann am Arginin eben so, daß Harnstoff als solcher auftritt, ohne daß nochmals das Stadium des Citrullins durchlaufen wird. Würde erst wieder die einfache Desaminirung an der freien NH_2-Gruppe erfolgen, so wäre der Zweck verfehlt, und Harnstoff könnte nicht mehr entstehen. Der Weg der Synthese ist ja grade der, durch Umlagerung der Valenzen aus Ammoncarbonat CO $(NH_4)_2$ die WÖHLER'sche Synthese auf katalytischem Wege zu vollziehen, wobei Ornithin als echter nicht enzymatischer Zwischenkatalysator fungirt, der immer wieder regenerirt wird.

$$\underset{\text{Ornithin (Diaminovaleriansäure)}}{H_2N\cdot CH_2\cdot (CH_2)_2\cdot \underset{COOH}{CH}\cdot NH_2} + CO_2 + NH_3 \longrightarrow \underset{\text{Citrullin}}{\begin{array}{l}O \\ H_2N\end{array}\!\!\!> C—HN\cdot CH_2\cdot (CH_2)_2\cdot \underset{COOH}{CH}\cdot NH_2}$$

$$\xrightarrow{+NH_3} \underset{\text{Arginin}}{\begin{array}{l}HN \\ H_2N\end{array}\!\!\!> C—NH\cdot CH_2\cdot (CH_2)_2\cdot \underset{COOH}{CH}\cdot NH_2} \xrightarrow{+H_2O} \underset{\text{Harnstoff}}{\begin{array}{l}H_2N \\ H_2N\end{array}\!\!\!> CO} + \underset{\text{Ornithin}}{H_2N\cdot (CH_2)_3\cdot \underset{COOH}{CH}\cdot NH_2}$$

78) ***H. Steib***, d,l-α-Methylarginin.—ε-Guanido-α-amino-n-capronsäure. Zs. phys. Chem., **155**, 279, 292 (1926). — 79) ***E. Baldwin***, Arginase and arcain. Biochem. Jl., **28**, 1155 (1934). — 80) ***L. Zervas, M. Bergmann***, Das sog. Arginyl-arginin von E. FISCHER. Ber. Chem. Ges. **61**, 1195 (1928). S.A. — 81) ***A. Kossel, W. Staudt***, Argininpeptid aus Clupein. Zs. phys. Chem., **170**, 91 (1927). — 82) ***J. A. Dauphinee, A. Hunter***, Rate of liber. of arginin in tryptic dig. Biochem. Jl., **24**, 1128 (1930). — 83) ***A. Hunter***, Temp. coeff. etc. of enz. hydrol. of arginine. Quart. Jl. Exp. Phys., **24**, 177 (1934); BPh **83**, 198. — 84) ***H. A. Krebs, K. Henseleit***, Harnstoffbildung. Klin. Ws., **1932**, I, 757; Zs. phys. Chem., **210**, 33 (1932). S.A. — 85) ***M. Wada***, Citrullin. Bioch. Zs., **224**, 420 (1930).

Aber der Vorgang verläuft anscheinend nicht absolut rein; Citrullin konnte ebenfalls gefaßt werden, wenn auch nicht regelmäßig. Sein natürliches Vorkommen (Entdeckung in der Wassermelone *Citrullus*) kann ja auch als Aufbaureaktion der biologischen Argininsynthese gedeutet werden. Aber WADA 86) konnte es auch beim enzymatischen Proteinabbau nachweisen. Es ist nur sehr empfindlich und kann nur bei neutraler Reaktion im tryptischen Abbau gefaßt werden; schon verdünnte Alkalien spalten in Ornithin auf, verd. Säuren führen in Prolin über.

ACKERMANN 87) und HORN 87a) fanden es bei der Fäulnis von Arginin, resp. Einwirkung von *Bac. pyocyaneus*; dagegen konnte es bei Versuchen mit Organen (Säugetiere, Vögel, *Potamobius*) nicht gefaßt werden (88); es wird dort dürch Reduction zu Harnstoff (88a)).

Einfluß von Ionen und Giften. Nach älteren Angaben (H.W. S. 794) hemmt Ca, Phosphate fördern. Von Spaltprodukten hemmt Ornithin, nicht Harnstoff.

HINO 72) fand Cl′ und Br′ ohne Einfluß, F′ hemmt schon in geringer Konz. (4 mg %); ebenso freies Jod. Cu und Hg hemmen intensiv (62), Cu bei m/3000 noch 30 %, m/100 fast völlig. Nach KIRIAN 88b) ist die Inaktivirung durch Fe^{+++}, Hg^{++} und Cu^{++} nur bei ph = 6 nachweisbar, beim opt. ph unbedeutend (Cu) oder nicht vorhanden, während Sn^{++} hier hemmt. Mn, Zn in beiden Fällen ohne Einfluß. Es sollen nur die Ionen hemmen, die oxydirend wirken, worauf unten einzugehen sein wird.

Gallensäuren fördern (89), Na-Cholat bei 0,1—0,3 %, Desoxycholat hemmt bei 0,3 %, fördert bei 0,1 %. Kochsäfte aus Tumoren hemmen stark; es handelt sich um Eiweißabbaustoffe, da Peptone ebenso wirken (89a)).

Aktivirung und Hemmung durch Redox-Systeme. Den Ausgangspunkt dieser ganz allgemein für die Enzymlehre sehr wichtig gewordenen Beobachtungen bildet der Befund von EDLBACHER 90), daß Blutserum einen specifischen Hemmungskörper enthält.

Er wirkt stark, aber nur beim opt. ph bis 9,25, unter 7,0 fördert das Serum. Er wirkt nicht auf alle Präparate und nur bis zu einem Grenzwert, der auch bei Zusatz von mehr Serum nicht überschritten wird. Beim Altern des Serums geht die Wirkung verloren; sie ist nicht artspecifisch, hat nichts damit zu tun, ob das betr. Blut Arginase enthält (§ 439); wohl aber ist die Tierart wichtig, von der die Arginase stammt: z. B. werden die Enzyme von Hund und Kaninchen nicht gehemmt. Der Hemmungskörper ist thermostabil, bleibt aber beim Koaguliren am Protein adsorbirt, so daß das Zentrifugat unwirksam ist.

Spätere Untersuchungen führten dann EDLBACHER 91) zu der Ansicht, daß diese Hemmung durch Serum in Zusammenhang zu bringen ist mit der Inaktivirung durch Komplexbildner in dem Sinne, daß man das Agon der Arginase als ein Schwermetall anzusehen hat, das durch Komplexbildung in den inaktiven Zustand übergeführt wird, wie dies bei den Eisenkatalysatoren der Fall ist. E. fand im Sauren bis zu ph = 7 eine sehr starke Hemmung (bis 90 %) durch HCN, Cystein und Glutathion bis zu m/1000; bei dem optimalen ph = 9,4 wirken sie nicht, bei Cystein bisweilen geringfügige Aktivirung. KLEIN u. ZIESE 92) haben diese Angaben bestätigt; sie fanden nur bei Tumor-arginase Aktivirung bei kleineren Konzz., bei größeren auch hier Hemmung, auch beim opt. ph (110). Danach würde sich also Arginase

---

86) ***M. Wada***, Isol. des Citrullins aus trypt. Verdau. Prod. des Caseins. Bioch. Zs., **257**, 1 (1933). — 87) ***D. Ackermann***, Biol. Abbau des Arginins zum Citrullin. Verh. Phys. Med. Ges. Würzburg, **56**, 118 (1931); BPh **72**, 237. — 87a) ***F. Horn***, Abbau des Arginins zu Citrullin etc. Zs. phys. Ch. **216**, 244 (1933). — 88) ***D. Ackermann***, Frage der Entsteh. von Citrullin. Zs. phys. Chem., **209**, 12 (1932). — 88a) ***M. Wada***, Bild. des Harnstoffs aus Uraminosäuren. Proc. Imp. Acad. Tokyo, **10**, 17 (1934). — 88b) ***W. Kirian, L. Solowjew***, Einfl. der Salze der Schwermetalle auf Arginase. Arch. Biol. Nauk, **37**, 417 (1935) (russ.); BPh **89**, 160. — 89) ***T. Hatakeyama***, Einfl. der Gallens. auf die Arginasewirk. Arb. Med. Univ. Okayama, **1**, 383 (1929); BPh **54**, 812. — 89a) ***G. Klein, W. Ziese***, Wirk. von Koch- und Nativsäften etc. auf Arginase etc. Zs. phys. Chem., **218**, 217 (1932). S.A. — 90) ***S. Edlbacher, F. Krause, K. W. Merz***, Vork. von Arginase im Blut etc. Zs. phys. Chem., **170**, 68 (1927). S.A. — 90) ***S. Edlbacher, J. Kraus, G. Walter***, Arginase VII. Aktiv. u. Hemm. Zs. phys. Chem., **206**, 65 (1932). S.A. — 92) ***G. Klein, W. Ziese***, Aktivirbark. von Leberarginase durch Cystein etc. Zs. phys. Chem., **211**, 23, **218**, 201 (1932). S.A.

grade umgekehrt verhalten wie die Proteinasen vom Papaintypus, die durch Thiole aktivirt werden. Diesen Ergebnissen standen nun Befunde von WALDSCHMIDT-LEITZ **93)**, sowie SALASKIN **94/5)** gegenüber, die eine Aktivirung der Arginase durch Thiole angaben, so daß W.-L. sogar aussprach, daß ohne SH-Verbindungen (die „Zoo-Kinase" der Proteasen) Arginase garnicht wirkt.

Die Sache hat nun eine sehr interessante Aufklärung gefunden, wenn auch noch nicht alle Einzelheiten widerspruchsfrei sind. Die von EDLBACHER gefundene Hemmung bei seinen Versuchsbedingungen ist an sich richtig; aber sie trifft nach SALASKIN **95)** und WALDSCHMIDT-LEITZ **96)** nicht den Kern der Sache. Im physiologischen Milieu wirken die Thiole nicht allein, sondern in Form von komplexen Eisensalzen, und dann nicht hemmend, sondern stark aktivirend, auch bei schwach saurer Reaktion. Die mehr oder minder ausreichende Anwesenheit von diesem Aktivatorsystem ist also ausschlaggebend für den Aktivitätsgrad und damit, wie es immer der Fall ist, für die „quantitative Bestimmung" in biologischen Objekten. Alle solche Zahlen haben natürlich nur dann Wert, wenn sie bei gleichem Aktivirungszustand erhalten werden; denn sonst bestimmt man eben nicht die „Menge" des Enzyms, sondern seinen zufälligen Aktivirungsgrad. Das sind ja Dinge, die wir immer wieder betonen müssen.

Ist somit die Frage, ob tatsächlich die Anwesenheit genügender Mengen an Aktivator die Vorbedingung für die Arginasewirkung ist, wesentlich für alle biologischen Messungen dieses Enzyms, so ist hier ebenso wie bei den Proteinasen — wo wir noch eingehender darauf zurückkommen werden — diese Aktivirung auch theoretisch für die Fermentwirkung überhaupt von großer prinzipieller Bedeutung, nämlich die Frage, wodurch sie zustande kommt. Wir werden bei den Proteinasen sehen, daß das Problem dahin steuert, daß die Thiole nicht — oder nicht allein — stofflich wirken, nicht als echte „Aktivatoren" in dem Sinne, daß sie Bestandteile des „Systems Enzym" sind; auch nicht allein — wenn dies auch wohl mitwirkt — dadurch, daß sie als Komplexbildner giftige Schwermetalle (Cu?) ausschalten. Ihre wesentliche Rolle scheint immer deutlicher sich als die herauszustellen, daß sie als reversible Redox-Systeme durch Schaffung einer bestimmten Potentiallage wirken. Dann würden also die Redox-potentiale der Zelle nicht nur — was selbstverständlich ist — entscheidend sein für die Desmolyse, sondern auch die Steuerung der hydrolytischen Stoffwechselvorgänge bewirken, eine Konzeption von noch garnicht abzusehender Bedeutung. Denn sie setzt voraus, daß die betr. Enzyme selbst ebenfalls reversible Redoxsysteme sein müssen, wie dies auch aus anderen Gründen speziell für einige Proteinasen wahrscheinlich gemacht worden ist. Es läuft darauf hinaus, daß ebenso wie die Desmolasen auch die — oder einige — Hydrolasen selbst in einem ganz bestimmten Redox-Zustand sein müssen, um voll aktiv zu sein, und daß eben die Zelle durch Einstellung dieses Potentials der Enzyme — neben den anderen Mechanismen, speziell der Regelung des Dispersionszustandes einschl. der Adsorption der Enzyme — ihren enzymatischen Apparat wahlweise, wie er grade gebraucht wird, in und außer Betrieb setzen kann. Eine volle Würdigung dieser fundamental neuen Gedankengänge wird dem Allg. Teil vorbehalten bleiben müssen.

Im Sonderfall der Arginase hat sich die Angelegenheit wie folgt weiter entwickelt:

---

93) ***E. Waldschmidt-Leitz c. s.***, Bed. des Glutathions für den Stoffw. Naturw., **1931**, 964. — 94) ***S. Salaskin, L. Solowjew***, Beeinfl. der Arginase d. Sauerstoff etc. Zs. phys. Chem., **200**, 259 (1931), **205**, 171 (1932). — 95) ***Dies.***, Aktiv. u. Hemmbark. ... Arginase durch Sauerstoff. Bioch. Zs., **250**, 503 (1932). — 96) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Scharikova, A. Schäffner***, Einfl. von SH-Verb. auf enzym. Proz. Zs. phys. Chem., **214**, 75 (1933). S.A.

EDLBACHER c. s. 91, 97) fanden, wie schon vorher SALASKIN 94) und MC CANCE 98), eine erhebliche Schädigung des Enzyms durch freien Sauerstoff, und zwar viel mehr (4—6 mal) der Arginase aus Tumoren, als der aus Leber; außerdem verschiebt O_2 den opt. ph der Tumorarginase auf ca. 7 (s. o.). Unterhalb ph = 6 tritt diese Hemmung durch O_2 nicht mehr ein. Glycerol wirkt schützend. In Ergänzung, resp. Abänderung ihrer ersten Befunde mit Thiolkörpern (nicht HCN) finden nun auch EDLBACHER c. s. bei ph > 7 eine Aktivirung, die zwar bei der Leberarginase nur schwach ist (10—20 %), bei der Tumorarginase aber bis zu 600 % ausmachen kann. Beide Enzymsysteme verhalten sich also verschieden, und beide im gleichen Sinne verschieden gegen Aktivirung durch SH und Schutz vor dem freien Sauerstoff. Tatsächlich wird sauerstoffgeschützte Arginase durch SH kaum noch aktivirt. Beide „Aktivatoren" wirken also in demselben Sinne und lassen sich nicht addiren. EDLBACHER deutet also die SH-Aktivirung dadurch, daß eben die SH-Gruppen den Sauerstoff „abfangen", und dadurch das an sich aktive Enzym schützen. Dasselbe sollen nun auch die Ferrosalze leisten. EDLBACHER nähert sich also schon bewußt der oben angedeuteten Leitlinie, daß die Oxydationslage entscheidend ist, aber seine Vorstellungen sind noch nicht präcis genug, weil sie SH und Fe^{++} noch als getrennte Aktoren betrachten, nicht die beiden zusammen als reversible Redoxsysteme im Komplex. Darauf weist WALDSCHMIDT-LEITZ 99, 100) hin. Es handelt sich nicht um einen „Schutz vor Sauerstoff"; denn völlig reducirte Systeme (Fe^{II} + Cystein in Wasserstoff) aktiviren ebensowenig wie reine Ox-Systeme (Fe^{III} + Cystin); im Gegenteil hemmen beide Extrem-Zustände. Nur die reversiblen Redox-Systeme aktiviren, also Fe^{II} + + Cystein in Luft, Fe^{II} + Cystin, Fe^{III} + Cystein in Luft. Ebenso wirken andere Systeme, wie Eisen-Alloxan, Oxyhaemoglobin. Es ist also kein irgendwie stofflicher Vorgang, sondern ein Vorgang am Enzymsystem selbst, und zwar verläuft er nur am freien Enzym, nicht an der Substrat-Enzym-Verbindung, am besten bei ph = 5. Das Enzym muß in Abhängigkeit vom Redox-Potential in einen bestimmten Zustand versetzt werden. Die Aktivirung des Enzyms ist mit dem Redox-Vorgang „energetisch gekoppelt". Das aktive Enzym wird die energiereichere Form darstellen. Es ist noch nicht zu entscheiden, ob das aktivirte Enzym eine reduzirte (z. B. eine ungesättigte) oder aber eine oxydirte (z. B. eine peroxydische oder eine radikalartige) Stufe ist; die letztere Annahme ist wahrscheinlicher. Denn die Inaktivirung bereits aktiver Arginase gelingt leicht und weitgehend durch Reduktionsmittel (Fe^{II} — Cystein in H_2), nur unvollkommen durch Oxydationsmittel (Fe^{III} — Cystin in Luft) (WALDSCHMIDT-LEITZ 101)).

EDLBACHER 102) fand weiterhin, daß Ascorbinsäure an sich ebenfalls unwirksam ist (bei Leber, nicht bei Tumorarginase 103)), wohl aber bei Gegenwart kleiner Mengen Cu aktivirt, und zwar auch wieder am besten bei Gegenwart von O_2, was er wieder mit der „Abfangung" des O_2 erklären will. KARRER 104) konnte dies nicht bestätigen, wohl aber die Aktivirung durch Ascorbinsäure + Eisen (Fe^{II} oder Fe^{III}). Cu in größeren Mengen hemmt, besonders wenn man Dehydro-ascorbinsäure nimmt. Cystein allein hemmt auch bei ph = 9,3, Fe hebt erst diese Hemmung auf, bei größeren Mengen Fe + Cystein starke Aktivirung. Cystein + Cu hemmt völlig. Fe^{II} und Fe^{III} aktiviren auch an sich; Lactoflavin hemmt mit und ohne Fe. Die Verhältnisse liegen also sehr komplicirt, was nicht zu verwundern ist, da eine exakte Potential-Einstellung von den verschiedensten Faktoren abhängig ist.

---

97) ***S. Edlbacher, J. Kraus, F. Leuthardt,*** Steu. der Arginasewirk. durch Sauerstoff. Zs. phys. Chem., **217**, 89 (1933). S.A. — 98) ***R. A. Mc Cance,*** Infl. of oxygen on the prod. of urea etc. Biochem. Jl., **19**, 134 (1925). — 99) ***E. Waldschmidt-Leitz, L. Weil, A. Purr,*** Steu. des Umsatzes von Eiweiß etc. durch Sulfhydryl. Zs. phys. Chem., **215**, 64 (1933). S.A. — 100) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Aktiv. von Enzymen (Vortrag). Zs. Elektrochem., **40**, 483 (1934). — 101) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Kocholaty,*** Aktiv. der Arginase. Naturwiss., **1933**, 848. S.A. — 102) ***S. Edlbacher, Fr. Leuthardt,*** Einfl. der Ascorbins. auf Arginasewirk. Klin. Ws., **1933**, H. 47. S.A. — 103) ***S. Edlbacher, F. Koller,*** Stoffw. der Tumoren IV. Zs. phys. Chem., **227**, 99 (1934). S.A. — 104) ***P. Karrer. F. Zehender,*** Beeinfl. der Arginasewirk. d. Cystein etc. Helv. Chim. Acta, **17**, 737 (1934).

Je nach dem allgemeinen Milieu wird der Einfluß der einzelnen Systeme auf verschiedene Fermentpräparate verschieden sein; denn auch die Begleitstoffe an sich müssen ja verschieden wirken (s. u.) (KLEIN **110**)). So fand im Einzelnen auch PURR **105/6**) wieder etwas andere Ergebnisse, wenn er auch mit der Grundvorstellung einig geht. Z. B. fand er wieder Cystein bei ph 9 fördernd; sonst aktivirende Wirkung von Eisensystemen mit Alloxan. Allantoin, Methylglyoxal, Thioessigsäure, schwächer mit Alloxantin, Harnsäure, Milchsäure. Auch Hydrazin aktivirt die Arginase (KLEIN **92**)); ebenso aber auch H_2S.

Demgegenüber hält die Schule EDLBACHER (LEUTHARDT u. KOLLER **107**)) daran fest, daß „Schutz vor dem Sauerstoff" durch dessen Abfangung das Entscheidende ist. Eines der Argumente ist, daß die Sauerstoffschädigung erst allmählich einsetzt, und daß die relative Empfindlichkeit für verschiedene Tierarten sehr verschieden ist. Ebenso ist nach EDLBACHER **103**) die Aktivirbarkeit für einzelne Gewebe verschieden; so ist Tumorarginase sehr stark aktivirbar, was WALDSCHMIDT-LEITZ **108**) bestätigt hat; und zwar ist es nach E. die Arginase des nekrotischen Gewebes, die durch Cystein dreimal so stark aktivirt wird wie das intakte Tumorgewebe. Es liegt dies daran (**109**), daß in den nekrotischen Geweben die natürlichen Aktivatoren, speziell die Ascorbinsäure, sehr spärlich vorhanden sind, während das aktive Tumorgewebe 10 mal so reich an Ascorbinsäure ist. Das Hauptargument ist aber, daß einfacher Entzug von O_2 ebenso stark wirkt wie alle Aktivatoren. Ascorbinsäure soll deswegen nur vorübergehend schützen, weil sie — besonders bei Gegenwart von Cu — zu schnell verbraucht wird. Fe^{II} soll nur deswegen bei Gegenwart von Cystein stärker aktiviren, weil es eben durch das Thiol vor Oxydation und unwirksamer Ausfällung als Fe^{III} geschützt wird. Weitere Einzelheiten sind ohne Interesse. Es steht hier Meinung gegen Meinung; es ist eben nicht möglich, bei Enzymen im Rohzustand mit gleichen Milieu-verhältnissen zu arbeiten, wie denn ja tatsächlich auch EDLBACHER ebenso wie SALASKIN beinahe mit jedem Präparat andere Erscheinungen findet.

So wichtig also diese Beobachtungen über das Verhalten von Roh-Arginase für die Betrachtung der vitalen Wirkung des Enzyms sind, rein enzymtypisch wird man erst dann ein klares Bild bekommen, wenn man das F. möglichst von seinen natürlichen Milieu losmacht, d. h. gereinigte Arginase untersucht. Dies ist von KLEIN u. ZIESE **110—112**) in Angriff genommen worden. Sie fanden, daß ein erheblicher Teil der Hemmungen und Aktivirungen auf abtrennbare Begleitstoffe zu beziehen ist; ferner, daß gereinigte A. bei jedem ph von H_2S und Thiolen gehemmt wird, nicht aber von SH + Fe; daß sie aber auch — entgegen der Annahme EDLBACHER's — gegen Sauerstoff völlig unempfindlich wird. Das Reinenzym wird (**111**) durch Oxydationsmittel kräftig aktivirt, so z. B. (ph = 9) geringe Mengen von H_2O_2, $KMnO_4$, K-persulfat, während rohe A. durch reducirende Mittel aktivirt wird. Es ist also wahrscheinlich auch das aktivirende System Cystein-Fe ein „oxydirendes" System, wie ja auch WALDSCHMIDT-LEITZ annimmt. Dagegen sind Mangansalze (ca. n/200) Aktivatoren, die unabhängig sind von Begleitstoffen und vom Redox-potential, von CO und HCN (**112**); ihre Wirkung kann noch nicht gedeutet werden; z. B. kann A. im Muskel nur durch diese Aktivirung nachgewiesen werden (l. c. 133a).

Will man eine generelle Deutung versuchen, so mag es diese sein: Arginase scheint ein Schwermetallsystem (mit Mangan?) zu sein, das im Sinne von WALDSCHMIDT-LEITZ nur im Ox-Zustand (oder als Peroxyd) aktiv ist. Ist es rein, so wird sein Agon

---

105) ***A. Purr***, Infl. of vitamin C on intracell. enz. action. Biochem. Jl., **27**, 1703 (1933). S.A. — 106) ***A. Purr, L. Weil***, Rel. of intermed. prod. to arginase activ. Biochem. Jl., **28**, 740 (1934). S.A. — 207) ***F. Leuthardt, F. Koller***, Aktivatoren der Arginase. Helv. Chim. Acta, **17**, 1030 (1934). S.A. — 108) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Mc. Donald c. s.***, Enzyme in Tumoren. Zs. phys. Chem., **219**, 115 (1933). — 109) ***S. Edlbacher, A. Jung***, Reducir. Subst. der Gewebe. ibid., **227**, 114 (1934). — 110) ***G. Klein, W. Ziese***, Bed. von Ferm.-Begleitstoffen für . . . Arginase etc. Zs. phys. Chem., **222**, 187 (1933). S.A. — 111) ***Dies.***, Verh. von Oxyd.-Mitteln geg. gerein. Arginase. ibid., **229**, 209 (1934). S.A. — 112) ***Dies.***, Mangansalze als Arginase-aktivatoren. Klin. Ws., **1935**, I, 205; S.A.

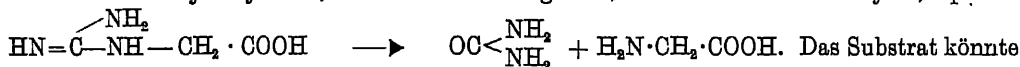
von Thiolen in einen unwirksamen Komplex übergeführt, zum mindesten < ph = 7. Andererseits aktiviren die Thiole, wenn sie selbst bereits komplex gebunden sind, eben durch Herstellung eines bestimmten Potentials oder eines grösseren Symplexes (s.u.). Die Sauerstoffhemmung beim Roh-enzym könnte dann als Zerfall der SH-Komplexe aufgefaßt werden (Ferri-cystein ist nicht beständig), so daß dann das freie Cystein hemmt. Natürlich ist das nur ein ganz primitiver Versuch, sich ein ungefähres Bild zu machen. Nach einer kurzen Mitt. von WALDSCHMIDT-LEITZ **112a)** nimmt er nunmehr an, daß neben dieser — oder durch diese — eine weitere Symplex-bindung zwischen dem Enzym und dem komplexen Aktivatorsystem erfolgt, die der Arginase eine erheblich gesteigerte Affinität zum Substrat verleiht. Noch stärker als SH-Fe-Komplexe, nämlich 10 mal mehr, aktiviren andere Fe-Komplexe, wie Tri-di-pyridyl-ferrosulfat (Priv. Mitt.) (**112b**)). Es scheint also nicht auf den Redox-Zustand des Enzyms an sich an, sondern auf den eines ganzen weiteren Systems Enzym-Schwermetallsystem-Träger anzukommen.

Anhang: Guanidinase. Ein Enzym, das nicht weiter gebundenes Guanidin selbst an der Iminogruppe desaminirend angreift und es in Harnstoff umwandelt,

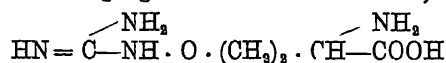
$$HN = C<^{NH_2}_{NH_2} \longrightarrow O = C<^{NH_2}_{NH_2}$$

ist mehrfach vergeblich gesucht worden. Arginase greift jedenfalls weder Guanidin, noch Guanidin-essigsäure (s. u.) und ihre Homologen an (die ältere Lit. bei IWANOFF **113**)).

IWANOFF **113**) hat nun in abgetötetem Mycel von *Aspergillus niger* nach Züchtung auf Nährboden mit Guanidin ein auf Guanidin eingestelltes Enzym gefunden; auf Pepton allein entsteht die Guanidinase nicht. Der lebende Pilz baut durch gleichzeitig gebildete Urease den Harnstoff weiter ab, das abgetötete und getrocknete Mycel enthält keine Urease, so daß Ū, bestimmt werden kann. Das Enzym fehlt in Fäulnisbakterien (**113a**)).

Glycocyamase. Entgegen älteren Beobachtungen soll nach KARASHIMA **114**) Säugetierleber-extrakt Glycocyamin, die Guanidino-essigsäure, in Harnstoff und Glycin, spalten

$$HN{=}\overset{NH_2}{C}{-}NH{-}CH_2 \cdot COOH \longrightarrow OC<^{NH_2}_{NH_2} + H_2N{\cdot}CH_2{\cdot}COOH.$$ Das Substrat könnte durch oxydativen β-Abbau aus Ornithin entstehen. Das Enzym scheint aber nicht Arginase zu sein, denn es fehlt in allen anderen Organen, sowie in der arginasereichen Vogelniere. Nachprüfung mit gereinigten Arginaselösungen wäre sehr erwünscht.

KITAGAWA **114a**) hat angegeben, daß in der Jackbohne *Canavalia ensiformis* ein Guanidin-Körper Canavanin vorkommt, der durch ein angeblich besonderes Ferment **Canavanase** in Harnstoff und eine Aminosäure Canalin zerlegt wird: $C_5H_{12}O_3N_4 + H_2O = CO(NH_2)_2 + C_4H_{10}O_3N_2$; opt. ph = 7,7. Bestätigung durch GULLAND **114b**). Formel des Canavanins:

$$HN{=}\overset{NH_2}{C}{-}NH \cdot O \cdot (CH_2)_2 \cdot \overset{NH_2}{C}H{-}COOH$$

Kreatin — Kreatinin. Zu dieser im H. W. § 802 dahin entschiedenen Frage, daß es kein specifisches Enzym gibt, das Kreatin in Kreatinin umwandelt, daß dies vielmehr nach HAHN (*l. c. 223*) und HAMMETT (*l. c. 224*) eine einfache Gleichgewichtsreaktion ist, sei hier ergänzt, daß nach HAHN **115**) injicirtes Kreatin nicht in Kreatinin übergeht, vielmehr in unbekannter

112a) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Progress in enz. chem. Nature, **1936**, I, 53. — 112b) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Rossi, W. Kocholaty*** (Aktiv. der Arginase). Zs. phys. Chem., **1936** (im Druck). — 113) ***N. N. Iwanoff, A. N. Awetissowa,*** Ferm. Umw. des Guanidins in Harnstoff. Bioch. Zs., **231**, 67 (1931). — 113a) ***Fr. Linneweh,*** Resist. des Guanidins etc. gegen bakt. Guanidodesamidase etc. Zs. phys. Ch. **207**, 152 (1932). — 114) ***J. Karashima,*** Glycocyamase. Zs. phys. Chem., **177**, 42 (1928). — 114a) ***M. Kitagawa c. s.,*** A new amino compound in the jackbean etc. Jl. of Bioch., **11**, 265 (1929), **16**, 339 (1932). — 114b) ***J. M. Gulland, C. J. O. R. Morris,*** Canavanine. Jl. of chem. Soc. **1935**, 763. — 115) ***A. Hahn, H. Fasold,*** Gegens. Umwandl. von Kreatin in Kreatinin. Zs. Biol., **88**, 283 (1925).

Weise abgebaut wird. Nach SIMOLA **115a)** dagegen werden von Organbrei weder Kreatin noch Kreatinin überhaupt angegriffen, außer wenn Bakterienbefall eintritt; dann wird Kreatin schnell, Kreatinin langsamer zerstört.

2) Vorkommen und Bedeutung.

§ 439. Das Vorkommen der Arginase steht in engstem Zusammenhang mit ihrer biologischen Bedeutung, und dementsprechend haben auch die Ansichten darüber gewechselt. Man hat mit verfeinerten Methoden das Enzym auch an Stellen gesucht, wo man es früher nicht aufgefunden hatte (oder nicht unbestritten), und es dann tatsächlich gefunden.

Im H. W. S. 794 haben wir den Stand dahin wiedergegeben, daß A. ausschließlich in der Leber, und zwar nur der Tiere vorhanden ist, die als Endprodukt Harnstoff bilden, also der Säugetiere, Amphibien und Fische, sowie eines Teils der Reptilien. Es wurde damit der Vorstellung Raum gegeben, daß die physiologische Funktion der Arginase nur im Lichte der ja zunächst offenbaren Harnstoffbildung aus Arginin zu betrachten wäre. Man glaubte damit einen Teil der Produktion von Ū gedeutet zu haben, die ja ein alleiniges Vorrecht der Leber ist. Dieser Teil wäre also eine rein hydrolytische Bildung von Ū; der Hauptteil der Harnstoffbildung sollte auf anderen Mechanismen direkter Synthese aus $CO_2 + NH_3$ beruhen, über die unendlich viel discutirt wurde. Die Rolle des Enzyms Arginase wurde nun aber weit über ihre ursprüngliche Bedeutung hinausgehoben, als KREBS (l. c. 84) die Entdeckung machte, daß die gesamte Harnstoffbildung in der Leber, also die Synthese aus dem aus allen Aminosäuren freigesetzten NH_3 zu Ū, durch die Arginasewirkung vermittelt wird. Es wirken hier zwei Katalysatoren gekoppelt, das Enzym Arginase und ein nicht enzymatischer Zwischenkatalysator, das Ornithin. Die gesamte Harnstoffsynthese geht derart vor sich, daß nach der S 570 gegebenen Reaktionsfolge sich 2 Moll. $NH_3 + 1\ CO_2$ an Ornithin anlagern, wobei Arginin entsteht, und daß dann die Arginase dieses NH_3 an CO_2 gebunden eben als Ū abspaltet. Da auch dieser Vorgang vollständig auf die Leber der in Frage kommenden Tierarten beschränkt ist, so schien es um so mehr gesichert, daß nur die Leber Arginase führt.

Indessen erwies sich diese Konzeption als zu eng. Das Enzym Arginase ist nicht auf die Stoffwechselfunktion der Harnstoffbildung in der Leber beschränkt, sondern hat eine viel allgemeinere Funktion. Besonders EDLBACHER (Lit. bei den einzelnen Organen, bes. bei Tumoren) hat die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß A. überall vorkommt, wo ein Stoffwechsel an den argininreichen Proteinen der Zellkerne stattfindet, dh. eigentlich in jeder Zelle, und daß das Enzym dort die Schwelle der Nachweisbarkeit überschreitet, wo diese Vorgänge lebhaft sind. Diese Prozesse haben nichts mit der allgemeinen Harnstoffbildung aus allen Aminosäuren zu tun, die nach wie vor der Leber zugeschrieben wird; beim Tumorgewebe ist gesondert nachgewiesen worden, daß ihm die Fähigkeit abgeht, den KREBS'schen Mechanismus zu vollziehen. Es entsteht also überall etwas Ū, aber sozusagen als Nebenprodukt, weil eben der reine Argininstoffwechsel zum Harnstoff führt; aber das ist eine geringe Menge gegenüber dem Ū als Endprodukt des Eiweiß-stoffwechsels überhaupt.

Dies ist der Fall z.B. bei der Niere, den Keimdrüsen etc., vor Allem aber den Tumoren. Es kommt nicht auf den Kernreichtum an sich an, denn so kernreiche

---

115a) ***P. E. Simola,*** Enzym. Kreatin-etc. Abbau im Tierorg. Ann. Acad. Sci. Fenn. A, **37,** Nr. 4, 1 (1933). S.A.

Organe wie Milz und Thymus enthalten sehr wenig Arginase, sondern auf die Intensität des Stoffwechsels, und dies bedeutet bei an sich lebenskräftigen Organen gesteigerte Zellteilung, wie sie besonders charakteristisch ist für Granulationsgewebe und maligne Tumoren; hier müssen also zur Vorbereitung des Aufbaus intensive Abbauprozesse am Arginin vor sich gehen. Außerdem fand EDLBACHER einen innigen Zusammenhang mit der Sexualität, und zwar ganz betont für das männliche Geschlecht: Zunahme nicht nur in den Keimdrüsen selbst, sondern auch in anderen Organen bei Sexual-vorgängen. Daß es aber nicht auf die Vitalität ankommt, sondern überhaupt nur darauf, daß intensiv abgebaut wird, zeigt der Umstand, daß auch in Necrosen reichlich Arginase vorhanden ist, wo sie also mit dem irreversiblen Zerfall der Kernsubstanz einhergeht (s.u. bei Tumoren).

Was nun die Harnstoffbildung anlangt, so muß man zwei Dinge unterscheiden: wo immer A. wirkt, muß etwas Ü entstehen, aber eben nur in dem Umfang, wie Arginin vorhanden ist, durch einfache Spaltung. So ist es zu deuten, wenn z.B. SALASKIN im Leberbrei **116)** und Placenta (l. c. 132) Argininschwund und Harnstoffbildung parallel fand. Die katalytische Harnstoffbildung dagegen ist ein Reservat der Leber (und nach IWANOFF, l. c. 152, der höheren Pilze); hier müssen also noch besondere, unbekannte Mechanismen gegeben sein, die im Leberbrei nicht mehr wirksam sind. Denn diese Harnstoffbildung ist eine energieverbrauchende Reaktion, die deshalb an die Atmung gekoppelt ist (KREBS, BORSOOK), und nur der intakten Zelle zukommt. Es ist ja auch keine Abbaureaktion mehr, sondern eine Entgiftung des NH_3. Bei reichlichem Angebot von NH_3 tritt neben diese Harnstoffsynthese noch eine fast ebenso starke Synthese von Alanin aus Brenztraubensäure, die also in der Leber mit der Arginasewirkung konkurrirt. Auch dieser Vorgang ist nach NEBER **117)** strukturgebunden, aber im Gegensatz zur Harnstoffsynthese nicht an die Atmung.

Diese Bedingungen muß man sich klar machen, wenn man die biologische Verteilung der A. richtig beurteilen will. Denn es ist danach zweifellos, daß A. überall aufgefunden werden kann — wenn nur die Methodik fein genug ist —, wo eben Arginin im Kernstoffwechsel umgesetzt wird. Dagegen ist es ebenso sicher, daß bei Betrachtung nur der Leber, in der die Kernprozesse gegenüber der Harnstoffbildung stark zurücktreten, Beziehungen eben zum Harnstoffwechsel vorhanden sein müssen. Das von CLEMENTI **118)** aufgestellte Gesetz der Verteilung der Arginase wird also dadurch nicht eingeschränkt, daß man auch in anderen Tieren in anderen Organen, und auch bei Vögeln geringe Mengen unter besonderen Verhältnissen (s. u.) auffinden kann. CLEMENTI hat die Tiere unterschieden, bei denen Ü das Endprodukt des Eiweißstoffwechsels ist (Ureotelischer Stoffwechsel), von denen, bei denen es Harnsäure ist (Uricotelischer Stoffwechsel), Leberarginase findet sich nur bei der ersten Gruppe, und dies sind neben den *Mammalia* nur noch die *Amphibia* und *Pisces*, von den *Reptilia* nur die Gruppe der Schildkröten. Alle anderen Reptilien und alle Vögel sind Uricoteliker und haben tatsächlich keine A.; ebensowenig die Wirbellosen, bei denen anscheinend der Protein-stoffwechsel ganz verschiedene, z.T. noch kaum bekannte Wege geht. (NH_3-Ausscheidung, Bildung von Ü auf anderen Wegen etc.). Auch die Harnstoffbildung in der Leber bei Autolyse, dh. der Verbrauch des vorhandenen Arginins, auf diesem Wege, findet sich nur bei den Ureotelikern.

---

116) ***S. Salaskin, L. Solowjew,*** Harnstoffbild. in überleb. Organen etc. Zs. phys. Chem., **192**, 28 (1930). — 117) ***M. Neber,*** Aminosäuresynthese aus Ketosäure u. Harnstoff-Synth. in der Leber. Zs. phys. Chem., **234**, 83 (1935). S.A. — 118) ***A. Clementi,*** Legge del arginasi e tipo ureotelico etc. Boll. Soc. Ital. Biol., **3**, 938, **5**, 1142 (1930); BPh **50**, 116, **61**, 78.

Allgemeines Vorkommen. Nach HUNTER u. DAUPHINEE **119)** findet sich A. auf der niederen Entwicklungsstufe von Haien (*Squalus sucklii*) noch in allen Organen außer Blut und Gehirn. Dann tritt eine Differenzirung ein, bei den Teleostiern noch nicht sicher und nach den Familien verschieden, z.B. betr. Muskel (s. u.). Der Befund an Haien gilt für alle Selachier **(120)**. Dann tritt bei den Säugetieren die Leber > Niere, bei den Teleostiern und Sauropsiden die Niere > Leber als Hauptorgan hervor. Bei den Reptilien enthält die Leber nur bei Schildkröten A., wie CLEMENTI **118)** an *Testudo graeca* festgestellt hat. Schlangen haben keine A. Bei Amphibien fand A. SENDJU **121)** in der Leber, nur teilweise in der Niere, bei Reptilien Niere, Leber, Milz, Pankreas, bei Vögeln nur Niere.

Bei allen Tieren fand EDLBACHER **126)** die A. zunehmend mit der geschlechtlichen Entwicklung (Leber, Niere), nach der Pubertät vielfach höher, und stets bei ♂ um 30—40 % höher als bei ♀. Bestätigung CHAUDHURY **122)** (Huhn) und GIERHAKE **123)** (Mensch).

Bei **Wirbellosen** kommt A. nicht vor (CLEMENTI **118)**, HUNTER **119)**); die Harnstoffbildung (die meist, aber nicht immer, gering ist) ist unerklärt (s. z.B. DELAUNAY **124)**).

Leber. Nach dem H. W. findet sich Arginase in der Leber der Säugetiere und Amphibien, fehlt bei Sauropsiden.

Das Fehlen bei Vögeln haben HUNTER u. DAUPHINEE **119)** bestätigt, fanden bei Reptilien etwas A.; ebenso SENDJU **121)** und CLEMENTI **118)**. Jedoch findet sich etwas A. auch bei Vögeln (EDLBACHER **125)**); nur bei ♂, fehlt bei ♀, resp. findet sich nur bei verstärkter Ovarialtätigkeit, z.B. bei Hennen im Sommer **(126)**. Bei Fischen überall **(120)**, bei Elasmobranchiern mehr als bei Teleostiern, bei diesen besonders arm die *Holocephali*. A. in der Leber von Fischen auch SENDJU **121)**.

Abnahme bei Tuberculose (*Cavia*), bei Carcinom nicht regelmäßig (Maus) (FUJIWARA **127)**). Keine Veränderung der Leberarginase bei parathyreopriven Hunden **(128)**. Das als toxisches Prinzip angesehene Guanidin entsteht also nicht aus Arginin durch fehlgeleiteten Abbau infolge Verminderung der Arginase.

Niere ist bei Säugetieren sehr arm **(119)**, dagegen ist die Niere der Vögel reich an A.; kommt hier auch beim ♀ vor, während Leber nur bei ♂ reichlicher Arginase enthält **(125)**. KIRK **129)** fand in der Niere von Hund und Ratte gar keine A., nur beim Frosch.

Nach Injection von Arginin reichert sich bei *Cavia* die Arginase an, ebenso im Muskel (EDLBACHER **130)**). Thyroxin hebt diesen Effekt auf, während es ohne Argininjection keine Wirkung hat. Abfall bei Tumormäusen, Tuberkulose (*Cavia*) (FUJIWARA **127)**).

Keimdrüsen. EDLBACHER **125), 126)** fand A. nur in den Hoden, nicht in Ovarien. Nach CHAUDHURY **122)** auch im Vas deferens, fehlt in Eiern (Hühner). Auch beim Menschen (GIERHAKE **123)**) wenig in Ovarien, bei Kindern fast keine A. in den Keimdrüsen.

---

119) ***A. Hunter, J. A. Dauphinee,*** Distrib. of arginase in fishes etc. Proc. Roy. Soc., **B. 97,** 227 (1924). — 120) ***A. Hunter,*** Further obs. on . . . arginase in fishes. Jl. of Biol. Chem., **81,** 505 (1929). — 121) ***Y. Sendju,*** Arginase in versch. Lebewesen. Jl. of Biochem., **5,** 229 (1925). — 122) ***A. C. Chaudhury,*** Arginase content in the fowl etc. Brit. Jl. exp. Biol., **5,** 97 (1927); BPh **45,** 408. — 123) ***E. Gierhake, H. Nasse,*** Arginase in menschl. Hoden etc. Arch. für Gyn., **143,** 592 (1931); BPh **62,** 631. — 124) ***H. Delaunay,*** L'excrét. azotée des invertebrés. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., **6,** 265 (1931); BPh **64,** 461. — 125) ***S. Edlbacher, P. Bonem,*** Arginase. Zs. phys. Chem., **145,** 69 (1925). S.A. — 126) ***S. Edlbacher, H. Röthler,*** Argininumsatz u. Sexualität. ibid., **148,** 273 (1925). S.A. — 127) ***H. Fujiwara,*** Argininstoffw. bei Tbc. und Carcinom. Zs. phys. Chem., **185,** 1 (1929). S.A. — 128) ***A. v. Beznák, K. Szeöke,*** Guanidinstoffw. u. Aktiv. der Leberarginase etc. Bioch. Zs., **239,** 159 (1931). — 129) ***E. Kirk,*** Exist. of a urea precursor. depot in kidney tissue. Jl. of Biol. Chem., **102,** 683 (1933). — 130) ***S. Edlbacher, Br. Schuler,*** Thyroxin und Argininstoffw. Zs. phys. Chem., **206,** 78 (1932). S.A.

Abgeschlossen: 20. 3. 36. Ber. Phys. 91, H. 3/4.

Placenta enthält nach WEHEFRITZ **131**) und SALASKIN **132**) eine ziemlich aktive A., die aus Proteinen bis 20 % des Arginins aufspaltet. Placenta bildet Harnstoff. Beziehungen zum Wachstum der Frucht GIERHAKE **123**), Abnahme gegen Ende der Gravidität.

Muskel ist im Allgemeinen frei von A. Heringsmuskel enthält A. (**119**), sie fehlt aber bei *Ophiodon elongatus*. Aktivirung bei Tumortieren (s. u.), auch bei Tuberculose (*Cavia*) (**127**). Vermehrung des Ū bei der Autolyse (80 h) SUNZERI **133**), im Gegensatz zu MYERS **134**), der auch nach vielen Tagen kein Ū fand. Nach KLEIN **133**a) scheint die Lösung der Widersprüche darin zu liegen, daß Muskel zwar meist A. enthält, aber in einer inaktiven Form, die nur bei Zusatz von Mangansalzen aktivirt und dann deutlich nachweisbar wird.

Herz enthält nur bei Fischen A. (**119**), und auch nur (**120**) bei einigen Familien der *Teleostomi* (*Clupeidae, Salmonidae, Embiotocidae*).

Milz, Schilddrüse, Pankreas enthalten keine A., Thymus sehr wenig (EDLBACHER **126**)) — Milz bei Tbc. (*Cavia*) enthält A. (FUJIWARA **127**)). Darmschleimhaut enthält nach EDLBACHER keine A., LUCK **135**) fand Bildung von Ū. Zunahme des Ū nach langer Autolyse bei Hunden auf der Höhe der Verdauung (SUNZERI **133**)).

Haut bei Gesunden meist keine A.: Vorkommen bei Kindern und Greisen, Menses, Gravidität, Lebercirrhose, ebenso auch bei Hautaffektionen, die mit der Leberfunktion zusammenhängen (OTTENSTEIN **136**)).

Blut. A. in roten B. K. von Säugetieren (Mensch, Rind, Hammel, Schwein, bei anderen nicht); Serum hemmt (s. o.) (EDLBACHER **137**)). Bei Ratten (♂) mehr bei reifen als bei jungen oder kastrirten Tieren, bei ♀ weniger. Gravidität ohne Einfluß (**138**). Bei graviden Frauen dagegen Vermehrung (GIERHAKE **123**)). Anscheinend auch bei malignen Tumoren Vermehrung (HADDOW **139**)).

Embryonen. Beim Huhn schnelle Abnahme während der Entwicklung (BRACHET u. NEEDHAM **140**)).

Tumoren. Ein großes Interesse hat seit einigen Jahren das Verhalten der Arginase in den Tumoren selbst und bei tumorkranken Menschen und Tieren gefunden. Einerseits zeigen die Roh-Enzyme selbst gewisse Abweichungen von denen normaler Gewebe, die wir bereits besprochen haben, so in bezug auf den optimalen ph, die viel stärkere Aktivirungsmöglichkeit etc. Ausserdem aber zeigen die Enzyme gewisse Zusammenhänge mit den biologischen Faktoren, die ja nicht grade dem Tumorgewebe allein zukommen, aber in ihm eine besonders scharfe Ausprägung finden. Die hier vorliegenden Fragen sind insbesondere von EDLBACHER **141—143**), KLEIN u. ZIESE **144/145**), sowie WALDSCHMIDT-LEITZ **146**) bearbeitet worden.

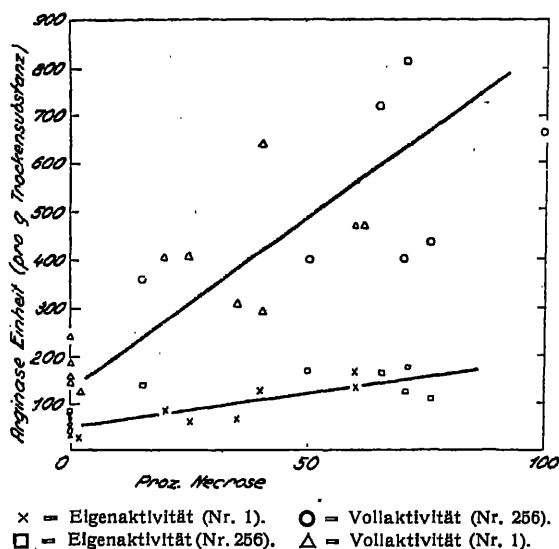
131) ***Wehefritz, E. Gierhake,*** Ferm.-Unt. in der Placenta. Arch. für Gynäkol., **135**, 212, **139**, 479 (1928/30). — 132) ***S. Salaskin, S. Solowjew, D. Tjukow,*** Harnstoffbild. in überlebenden Organen. Zs. phys. Chem., **205**, 1 (1932). — 133) ***G. Sunzeri,*** Genesi dell' urea nell' organismo. Ann. di Clin. Med., **17**, 1, 9, (1927); BPh **43**, 472. — 133a) ***G. Klein, W. Ziese,*** Arginase in normaler Skelettmuskul. Zs. phys. Chem., **235**, 246 (1935). S.A. — 134) ***V. C. Myers c. s.,*** Form. of urea in autol. Proc. Soc. Exp. Biol., **23**, 474 (1926); BPh **37**, 418. — 135) ***M. Luck,*** Ammonia prod. by animal tissues etc. Biochem. Jl., **18**, 814 (1924). — 136) ***B. Ottenstein,*** Arginase im Hautdialysat etc. Zs. exp. Med., **87**, 200 (1933). — 137) ***S. Edlbacher, F. Krause, K. W. Merz,*** Arginase im Blut etc. Zs. phys. Chem., **170**, 68 (1927). S.A. — 138) ***L. Weil, M. A. Russell,*** Blood arginase in rats. Jl. of biol. Chem., **106**, 505 (1934). — 139) ***A. Haddon,*** De-amining power of the blood in cancer. Lancet, **1931**, I, 1021; BPh **63**, 741. — 140) ***J. Brachet, J. Needham,*** Activ. de l'arginase pend. le développ. de l'embryon etc. Soc. Biol., **118**, 840 (1935); BPh **86**, 643. — 141) ***S. Edlbacher, K. W. Merz,*** Stoffw. der Tumoren. Zs. phys. Chem., **171**, 252 (1927). — 142) ***S. Edlbacher, J. Kraus, F. Leuthardt,*** Steu. der Arginasewirk. durch Sauerst. ibid., **217**, 89 (1933). S.A. — 143) ***S. Edlbacher, F. Koller,*** Stoffw. der Tumoren IV. ibid., **227**, 99 (1934). S.A. — 144) ***G. Klein, W. Ziese,*** Arginase und Arginin im Stoffw. der Tumoren. Zs. Krebsf., **37**, 323 (1932). — 145) ***Dies.,*** Tumor-Arginase. Zs. phys. Chem., **213**, 217, **222**, 187 (1932/3). S.A. — 146) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Mc. Donald c. s.,*** Enz. in Tumoren. Zs. phys. Chem., **219**, 115 (1933).

Es stellte sich zunächst heraus, daß der Tumor an sich sehr reich an Arginase ist, und zwar nicht nur der intakte stark vitale Tumor, sondern auch die Nekrose; die A. nimmt um so mehr zu, je älter der Tumor und je grösser der nekrotische Anteil wird (WALDSCHMIDT-LEITZ) (Abb. 57). Letzteres kommt allerdings erst dann deutlich zur Geltung, wenn man maximal aktivirt; denn infolge des Mangels natürlicher Aktivatoren (**146**) (l. c. 109) ist die Arginase im nekrotischen Gewebe wenig aktiv. EDLBACHER **141**) fand sehr aktiv Mäusecarcinome (Impfung und Teer), Rattensarcom JENSEN, menschliche Tumoren, ferner auch Granulations- und embryonales Gewebe. ROUS-Sarkom zeigt relativ niedrigen Gehalt. — Bei einem Melanosarcom (Pferd) fehlte A. völlig (PURR **147**)).

Abb. 57. Aktivirungsgrad der Arginase und Tumoralterung nach **146**).

EDLBACHER **143**) zieht daraus den schon oben als allgemeines Prinzip angegebenen Schluß, daß der reiche Arginasegehalt des Tumors bezeichnend ist für die erheblichen chemischen Vorgänge an den argininreichen Proteinen der Zellkerne, um so mehr, als sie von gleichermaßen intensivirten Vorgängen an den Nucleinsäuren begleitet sind (§ 429). Diese Vorgänge sind rein chemisch und damit enzymtypisch dieselben, ob es sich um Vorgänge der Zellteilung in den malignen Tumoren handelt, oder umgekehrt um Kernzerfall in den Nekrosen. Der Tumor kann mit Hilfe seiner Arginase (wie andere Gewebe auch, im Gegensatz zur Leber) nicht den Aufbau zu Harnstoff nach KREBS vollziehen, seine Arginase ist vielmehr nur ein Werkzeug des Abbaus (EDLBACHER **143**)).

Sehr eigenartig ist die Beobachtung (KLEIN), daß der Tumor auch auf das gesunde Gewebe Rückwirkungen hat. Normaler Muskel enthalt keine aktive Arginase. Wohl aber tritt — analog einer Phosphatase, §§ 293, 429 — eine A. im Muskel tumorkranker Tiere auf, und zwar sehr bald nach der Impfung, auch wenn der Tumor nicht angeht, und bleibt auch dann lange Zeit nachweisbar; ebenso auch nach der totalen Entfernung des Tumors. Da auch nach Injection von Tumor-extrakten im Muskel A. erscheint, so handelt es sich wohl nicht um eine Einwanderung von Tumorarginase, sondern um eine Aktivirung der an sich im Muskel vorhandenen A. Andererseits sind in Tumoren starke Hemmungskörper vorhanden. Es werden also auch die Wirkungen der A. in den Tumoren durch das ganze Milieu der Zelle und vor Allem die Oxydationslage beherrscht, wenn auch die ursprüngliche Einstellung EDLBACHER's, daß nämlich der betont „anoxybiontische" Stoffwechsel des Tumorgewebes im Sinne WARBURG's auch die Wirkung der Arginase aktivirt, im Einzelnen als zu eng anzusehen ist.

Bei **Pflanzen** kommt Arginase vielfach vor, anscheinend auch im Zusammenhang mit Kernvorgängen; so fand sie POLLER **148**) in Keimlingen von Bohnen u. dgl. Pflanzenwurzeln spalten Arginin (KLEIN **149**)). Jedoch kann A. auch beim gewöhnlichen Protein-Stoffwechsel hier eine erhebliche Rolle spielen, da die Phytoproteine reich an Arginin sind (KIESEL **150**)).

---

147) ***A. Purr***, Kathepsin und Arginase in einem Melanosarcom etc. Zs. Krebsf., **41**, 483 (1935). S.A. — 148) ***H. Poller***, Arginase. Zs. Biol., **86**, 309 (1927). — 149) ***G. Klein, K. Tauböck***, Phys. des Harnstoffs in der höheren Pflanze. Öst. bot. Zs., **76**, 194 (1927); BPh **44**, 758. — 149) ***A. Kiesel***, Harnstoff im Haushalt der Pflanze etc. Erg. Biol., **2**, 257 (1927); BPh **40**, 219.

Hefe greift Arginin überhaupt nicht an (KEIL, l. c. 162). Bei *Aspergillus oryzae* fand Arginase SENDJU (l. c. 121); auch bei *Asp. niger* wird auf Kosten von Arginin Ü gebildet, neben NH_3 (durch Desaminirung des Ornithins). Ohne Arginin kein Ü (IWANOFF **151**)). Wenn bei guter C-Ernährung auch Urease gebildet wird, bleibt kein Ü bestehen. Auch der Saft des Champignon (*Psalliota*) bildet aus Arginin Ü (**152**). Die höheren Pilze haben auch die Fähigkeit der Harnstoff-synthese, direkt aus Ammonsalzen, die niederen nicht; auch hier ist die Synthese von Ü streng an die lebende Zelle geknüpft, die Säfte zeigen nur noch die Spaltung. Wahrscheinlich hat also hier die Harnstoffsynthese denselben Mechanismus.

Bakterien. Emulsion von *B. pyocyaneus* enthält nach HINO (*l. c. 165*) und KOSSEL **153**) bisweilen A., andere Stämme aber nicht; diese zerstören zwar lebend Arginin aus argininhaltiger Nährlösung, aber anscheinend nicht mit Hilfe von Arginase, da sie beide Antipoden verbrauchen. In den meisten Bakterien fehlt sie (*l. c. 165*), auch bei *B. coli* (SENDJU l. c. 121).

III. Histidase.

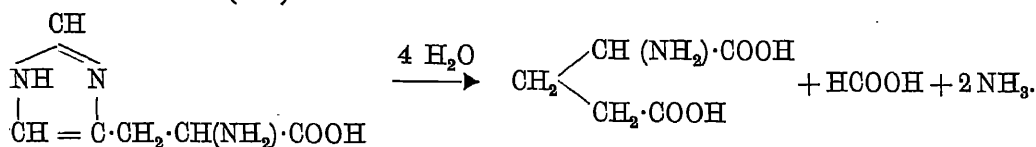
§ 440. Ein specifisch auf Histidin eingestelltes und unter Ringöffnung daraus NH_3 abspaltendes Ferment wurde gleichzeitig von GYÖRGY **154**) und von EDLBACHER **155—157**) aufgefunden, von letzterem Histidase genannt und genauer untersucht. Da die Reaktion auch anaerob stattfindet, handelt es sich nicht um eine oxydirende Kernspaltung resp. Desaminirung, sondern um eine hierher gehörige Enzymkatalyse. Ein Angriff von Histidin im Muskel, aber angeblich durch einen thermostabilen Katalysator, war schon vorher von CLIFFORD (l. c. 169a) angegeben worden.

Histidase ist streng specifisch, jedenfalls wirkt sie weder auf Arginin, noch auf Aminosäuren; auch alle nächsten Verwandten des l-Histidin sind refraktär; Histamin wird durch ein ganz anderes Enzym desaminirt (s. u.). Unspaltbar wurden befunden Methyl-histidin, Imidazyl-milchsäure, Histidin-methylester, Imidazol. Nach ABDERHALDEN **159**) wird auch d-Histidin angegriffen.

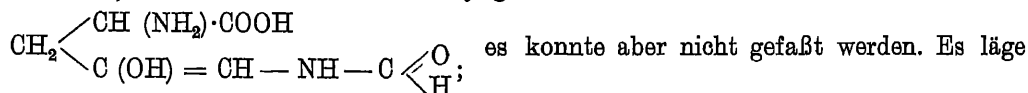
Der Abbau richtet sich nicht auf eine Desaminirung der Alanin-Seitenkette, sondern greift den Kern an; die Aminosäure bleibt intakt (s. u.). Dabei entsteht ein noch NH_3 lose bindendes Zwischenprodukt, das durch NaOH, nicht durch Soda zerlegt wird: behandelt man den Ansatz nach der Enzymwirkung zum Abblasen des NH_3 mit NaOH, so erhält man in toto ca 66 % des Gesamt-N als NH_3, nimmt man Soda, nur 30—45 % (EDLBACHER **156**)), bestätigt von KAUFFMANN **158**) und ABDERHALDEN **159**).

Die **Reaktions-Endprodukte** in diesem Sinne sind neben NH_3 Ameisensäure und Glutaminsäure (**156**):

$$\begin{array}{l} \quad CH \\ NH \quad N \\ | \qquad | \\ CH = C\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\cdot COOH \end{array} \xrightarrow{4\,H_2O} CH_2\begin{cases} CH\,(NH_2)\cdot COOH \\ CH_2\cdot COOH \end{cases} + HCOOH + 2\,NH_3.$$

---

151) ***N. N. Iwanoff,*** Urspr. des von Schimmelpilzen ausgesch. Harnstoffs. Bioch. Zs., **162,** 425 (1925). — 152) ***N. N. Iwanoff, A. Toschewikowa,*** Harnstoffbild. bei Champignons. ibid., **181,** 1 (1927). — 153) ***A. Kossel, F. Curtius,*** Bakterienarginase. Zs. phys. Chem., **148,** 283 (1925). — 154) ***P. György, H. Röthler,*** Autolyt. Ammoniakbild. in den Geweben II. Bioch. Zs., **178,** 334 (1926). — 155) ***S. Edlbacher,*** Intermed. Stoffw. des Histidins. Zs. phys. Chem., **157,** 106 (1926). S.A. — 156) ***S. Edlbacher, J. Kraus,*** Intermed. Stoffw. des Histidins II, III. ibid., **191,** 225, **195,** 267 (1930). S.A. — 157) ***S. Edlbacher, M. Neber,*** Intermed. Stoffw. des Histidins. IV. ibid., **224,** 261 (1934). S.A. — 158) ***Fr. Kauffmann, E. Mislowitzer,*** Ferm. Abbau des Histidins. Bioch. Zs., **226,** 325, **234,** 101 (1930/1). — 159) ***E. Abderhalden, S. Buadze,*** Schicksal des Histidins im tier. Org. Zs. phys. Chem., **200,** 87 (1931).

Rein enzymatisch wird nach dem oben Gesagten sicherlich 1 NH_3 gebildet, das um dieses N ärmere Zwischenprodukt ist in geringer Menge isolirt; darin ist schon der Kern gesprengt (Diazoreaktion verschwunden); die Weiterspaltung geschieht auch schon z.T. durch das Enzym, da mehr als 33 % NH_3 abgespalten werden, schnell durch NaOH. Nach **157)** scheint es sich um Formylglutamin zu handeln, in der Lactimform:

$$CH_2\begin{cases} CH\,(NH_2)\cdot COOH \\ C\,(OH) = CH - NH - C\begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown H \end{matrix} \end{cases};$$

es konnte aber nicht gefaßt werden. Es läge hier also eine Kombination einer Kernaufspaltung mit der einer Aminbindung vor; letztere scheint nicht enzymatisch zu sein, vielmehr durch Alkali allein zu erfolgen.

Herstellung wirksamer Präparate durch wässerige oder Glycerolextrakte. Bei der Reinigung der Arginase geht die Histidase verloren (l. c. 59); beide haben also nichts mit einander zu tun. Reinigung über Adsorption an Tonerde $C\gamma$ oder Kaolin bei saurer Reaktion, Elution mit Phosphat. Das Enzym besteht aus einem unlöslichen und einem löslichen Anteil, die nur gemeinsam wirken **(156)**. — Absperrung von O_2 und SH-Gruppen aktiviren nicht, höhere Konzz. von Cystein hemmen (Edlbacher l. c. 62). — Trypsin zerstört **(156)**.

Einheit (156): Enzymmenge, die aus Histidin in 6 h 8 cm^3 n/50 NH_3 freisetzt.

Temperatur: stabil bei 50°, bei 70° in 10′ starke Schädigung. **opt. ph.** = 8,0 — 9,0, bei ph = 5,0 noch Wirkung.

Vorkommen: nur in der Leber, nachgewiesen bei Mensch, Katze, Rind, Ratte, Maus, Hund, Kaninchen, *Cavia*, Gans, Huhn, Frosch. Seltsamerweise ist der Abbau bei der Durchströmung der Säugetierleber kaum nachweisbar. Leberschnitte geben anstatt NH_3 Harnstoff **(158)**.

Keine Änderung der Leberwirkung nach Injektion von histidinhaltigem Antigen, also keine Beziehung zum anaphylactischen Shok (Rigoni **159a**, **160)**).

Magenschleimhaut desaminirt nur höchstens zu 34 % (Sakisaka **161)**). Auch Hefe spaltet Histidin völlig auf, (Keil **162)**); enzymtypische Klarstellung des Vorganges ist aber noch nicht gelungen, jedenfalls findet keine Desaminirung am Alaninkern zu „Histidol", wie sonst durch Hefen nach F. Ehrlich statt.

§ 441. Anhang: 1) Histaminase. Über die Selbständigkeit und Gruppenzugehörigkeit dieses Fermentes ist noch keine volle Klarheit zu gewinnen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich trotz einiger abweichenden Beobachtungen bzgl. Vorkommen einfach um Histidase handelt; es ist aber eher wahrscheinlich, daß es sich um eine „Oxydase" wie die in verwandter Weise wirkende Tyramin-oxydase handelt. Dafür spricht die Angabe, daß die Reaktion bei Anwesenheit von Luft beschleunigt wird und O_2 verbraucht. Das ist aber noch kein Beweis, denn der O_2-Verbrauch kann rein chemisch an einem enzymatisch entstandenen Zwischenprodukt ansetzen. Tyramin wird nicht angegriffen. Wir wollen sie hier kurz erwähnen und bei den Oxydasen nochmals darauf verweisen. Dagegen ist die von Weil-Malherbe und Krebs **162a)** aufgedeckte Sprengung des verwandten Pyrrol-ringes eine Oxydation und hier nicht zu behandeln.

Best c.s. **163)**, **164)** beobachteten die Zerstörung des Histamins in verschiedenen Organen und führen sie auf ein besonderes Enzym zurück, das sie Histaminase nennen.

Es spaltet nach den ersten Angaben ebenfalls den Kern auf; und da sich Histamin =

159a) ***M. Rigoni,*** Ricambio istidinico nello shok anafil. Boll. Soc. Ital. Biol., **6,** 886 (1931). — 160) ***M. Rigoni,*** Attiv. desam. l'istidina etc. Bioch. Ter. Sper., **18,** 365 (1931). — 161) ***S. Sakisaka,*** Ferm. decomp. of histidine. Fukuoka Jkw. Zasshi, **27,** H. 4 (1934) (jap.); BPh **80,** 515. — 162) ***W. Keil,*** Verh. von l-Histidin bei der Hefegärung. Zs. phys. Chem., **207,** 275 (1932). — 162a) ***H. Weil-Malherbe, H. A. Krebs,*** Convers. of proline into glutam. acid. etc. Biochem. Jl., **29,** 2077 (1935). S.A. — 163) ***C. H. Best,*** Disapp. of histamine from autolys. lung tissue. Jl. of Phys., **67,** 256 (1929). — 164) ***C. H. Best, E. W. Mc Henry,*** Inactiv. of histamine. Jl. of Phys., **70,** 349 (1930).

Imidazyl-aethylamin nur durch das Fehlen der Carboxyl-Gruppe vom Histidin unterscheidet, so könnte es an sich durch dasselbe Enzym gespalten werden. Wenn allerdings die spätere Angabe von Mc.Henry **165)** sich bestätigt, daß nur 1 Mol. NH_3 abgespalten wird, so dürfte wohl keine Kernaufspaltung erfolgen und dann das Enzym dicht an die Tyramin-oxydase heranrücken.

Es ist am besten aus Niere (entfettet, getrocknet) zu erhalten; in wäss. Lösung nicht beständig, wohl aber in Glycerol; kann aber auch in Wasser im Vakuum konzentrirt, sowie durch Ammonsulfat gefällt werden. Reinigung durch Acetonfällung, nicht Alkohol-Aether, was zerstörend wirkt **(165)** — **Opt. ph** = 7—8. Opt. Temp. 37°. Phosphat aktivirt; Ca hemmt stark, ebenso Sulfate. Wirkung etwa proportional der Menge und $\sqrt{t}$ (Mori **166)**).

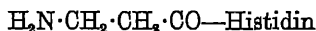
Gegen die Identität mit Histidase spricht das Vorkommen. Das Enzym ist am reichlichsten in der Niere enthalten, und grade in Leber am wenigsten. Reichlich in Darmschleimhaut, weniger in Lunge, Pankreas, Milz, Muskel, wenig in Herzmuskel und Blut, fehlt in Haut und Harn. Fehlt in der Niere von Nagern und Huhn, am meisten beim Schwein **(165)**).

Injicirte Histaminase hat auf die Histaminwirkung am Magen (Pawlow-Hund) keinen Einfluß **(167)**; zerstört aber die histaminähnliche „Shoksubstanz" aus der Lunge **(168)**).

Auf den **Sauerstoffverbrauch** hatte schon Best **164)** hingewiesen. Nach Gebauer-Fülnegg **168a)** ist die O_2-Aufnahme (Enzym aus Niere) parallel der Abnahme der Histamin-wirkung, sie ist aber nicht konstant, was wie erwähnt vorläufig auch noch auf sekundäre Oxydationsreaktionen am hydrolytisch geöffneten Imidazolkern bezogen werden kann; auch die Geschwindigkeit der Aufnahme ist nicht parallel dem Verschwinden des Histamin. CO_2 tritt nicht auf. KCN 0,002 m hemmt zu 60 %, jedoch war wieder der gesamte O_2-Verbrauch unabhängig vom KCN. CO und Pyrophosphat hemmen nicht. Histidin und andere Imidazolderivate verbrauchen keinen Sauerstoff.

Wichtiger ist die Angabe von Mc. Henry **165)**, daß das Enzym in Stickstoff garnicht wirkt, d.h. eben das Histamin unverändert läßt. Nach allem ist es zwar wahrscheinlich, aber nicht ganz sicher, daß es sich um eine „Oxydase" handelt, die in der Wirkung den anderen oxydativ desaminirenden Enzymen verwandt ist. Wir werden deshalb dort nochmals auf die hier gegebenen Einzelheiten verweisen und Weiteres ergänzen.

2) **Spaltung und Abbau von Carnosin.** Noch unklarer ist die Sachlage bei den ja wohl irgendwie enzymatischen Vorgängen am Carnosin. Dies ist ein β-Alanyl-l-histidin, also kein echtes Dipeptid, da β-Aminosäuren im Protein-molekül nicht vorkommen. Nach seiner Formel

$$H_2N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO\text{—Histidin}$$

wird man seine Entstehung als Muskelbase wohl auf eine Decarboxylirung des echten Dipeptids l-Asparagyl-histidin zurückführen können; eine Entstehung von β-Alanin aus Asparaginsäure durch Bakterien ist z.B. 1911 von Ackermann beobachtet worden; s.a. **168b)**.

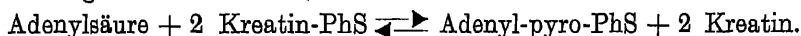
Im Muskelbrei wird Carnosin abgebaut (Clifford **169)**), Hunter **170)**), und zwar soll es durch Kernaufspaltung völlig verschwinden. Nach Clifford soll aber ein thermostabiler Katalysator dabei mitwirken, der bei Wirbellosen fehlt, bei Vertebraten auch in der Niere, in der Leber vorhanden ist; er greift auch Histidin an.

165) ***E. W. Mc Henry, G. Gavin,*** Histaminase. Jl. of Biol. Chem., **92,** LXXV (1931); Trans. Roy. Soc. Canada V. Biol. Sci. (III), **25,** 101, **26,** 321 (1931/2); Biochem. Jl. **26,** 1365 (1932). — 166) ***N. Mori,*** Wirk.-Weise der Histaminase. Okay. Jg. Zasshi, **47,** 413 (1935). Ber. Physikal. Ges., **88,** 285. — 167) ***A. J. Atkinson,*** Act. of histaminase on gastric secr. etc. Amer. Jl. Phys., **107,** 168 (1934). — 168) ***I. deBurgh Daly, H. Schild,*** Inactiv. by histaminase . . . of the histaminelike substance etc. Jl. of Phys., **83,** 3 (Proc.) (1934); BPh **88,** 653, — 168a) ***E. Gebauer-Fuelnegg, H. L. Alt,*** Manom. stud. on the biooxid, of histamine. Proc. Soc. Exp. Biol., **29,** 531 (1932). — 168b) ***S. Kaplansky,*** Extraktivstoffe der Muskeln. Zs. phys. Chem., **158,** 19 (1926). — 169) ***W. M. Clifford,*** Eff. of cold storage on the carnosin content of muscle. Biochem. Jl., **16,** 341, (1922). — 169a) ***W. M. Clifford,*** Catal. destr. of carnosin in vitro. ibid., **16,** 792, **17,** 549 (1922/23). — 170) ***G. Hunter,*** Carnosine of muscle etc. Biochem. Jl., **19,** 34 (1925).

Ob hier nun erst durch eine Dipeptidase — Carnosin soll auch durch Erepsin gespalten werden — freies Histidin entsteht, oder gleich durch eine Abart der Histidase der Kern angegriffen wird, ist unaufgeklärt. Da die echte Histidase fast allein in der Leber vorkommt, ist eher ein spezifisches Enzym für Carnosin anzunehmen. Edlbacher (l. c. 156) fand eine Carnosinspaltung von 20 % durch sein Histidase-präparat. Andererseits soll nach Hunter **170)** dem Carnosinschwund in den Muskeln (bei Hungertieren) eine Mehrausscheidung eines Imidazolkörpers im Harn parallel gehen. Reinwein **171)** fand Histidin im Fruchtwasser, das er als aus Carnosin entstanden betrachtet. Als Endprodukt im Muskelbrei tritt Ammoniak auf **171a)**.

IV. Phosphaminasen.

§ 442. Im Anschluß an die Carbaminasen kann man die bisher kaum erschlossene Gruppe der sog. Phosphamidasen unterbringen, da auch hier keine Säure-amidbindung in den natürlichen Substraten vorliegt, vielmehr der Stickstoff einerseits an Kohlenstoff, andererseits an Phosphor gebunden ist. Man sollte also die Enzyme besser Phosphaminasen nennen. Alles, was um diese neue Fermentgruppe sich herum bewegt, ist noch völlig unklar. Die natürlichen Substrate sind die Phosphagene des Muskels, von denen wir selbstverständlich wissen, daß sie zerlegt werden und zwar natürlich zwischen N und P, also auf den ersten Blick durch eben eine Phosphaminase. Aber es ist nach den letzten Befunden, die wir andeutungsweise bereits S. 110 angeführt haben, und auf die wir beim Zuckerabbau zurückkommen werden, zum mindesten das Eine sicher, daß hier glatte Hydrolysen garnicht in Frage kommen, sondern ausschließlich reversible Gleichgewichtsreaktionen, hier zunächst interessirend z.B. die Reaktion (**172)**):

$$\text{Adenylsäure} + 2 \text{ Kreatin-PhS} \rightleftarrows \text{Adenyl-pyro-PhS} + 2 \text{ Kreatin.}$$

Das ließe eher annehmen, daß die Reaktion in beiden Richtungen durch denselben Katalysator bewirkt wird, also die Adenyl-pyro-phosphatase; oder daß sie vielleicht von links nach rechts überhaupt keiner specifischen enzymatischen Katalyse bedarf. Diese Dinge sind bisher weder theoretisch noch experimentell zu durchschauen.

Die so herausgeschnittene ist aber nur eine der anscheinend vielfachen Reaktionen, in denen zum Zwecke des endgiltigen Zuckerabbaus Kreatin-PhS entsteht und wieder zerlegt wird. Es sei hier nur noch eine erwähnt, die in jüngster Zeit von der Schule Meyerhof als eine der entscheidenden angesehen wird, um den abgebauten Zucker endgiltig zu dephosphoryliren, nämlich die Koppelung von Phospho-brenztraubensäure + Kreatin, die ebenfalls reversibel ist:

$$\text{Phospho-brenztr. S.} + \text{Kreatin} \rightleftarrows \text{Kreatin-PhS} + \text{Brenztraubens.,}$$

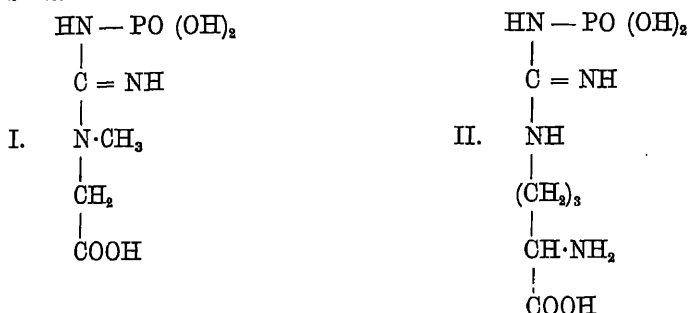
(vgl. S. 110, l. c. 54a). Die Reaktion erfolgt nur bei Anwesenheit von Adenyl-pyro-PhS, sodaß sie wahrscheinlich in die oben genannte Reaktion einmündet. Das ist hier gleichgiltig, es soll nur gezeigt werden, daß wahrscheinlich ein glatter hydrolytischer Zerfall der Kreatin-PhS physiologisch garnicht in Betracht kommt, und somit die Existenz eines besonderen Enzyms unwahrscheinlich ist.

Waldschmidt-Leitz **173)** nimmt allerdings (wegen der verschiedenen Aktivität gegenüber den Substraten) für die rein hydrolytische Spaltung der Phosphagene eine besondere, nicht mit der Phospho-Esterase identische Phosphatase, eben eine

---

171) ***H. Reinwein, H. Heinlein,*** Zusammens. des Fruchtwassers. Zs. Biol., **81**, 283 (1924). — 171a) ***A. N. Parschin c. s.,*** Spalt. des Carnosins unter dem Einfl. der Muskelferm. Arch. biol. Nauk. (russ.), **37**, 353 (1935); BPh **88**, 179. — 172) ***K. Lohmann,*** Enz. Aufspalt. der Kreatin-PhS etc. Bioch. Zs. **271**, 264 (1934). S.A. — 173) ***E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Köhler,*** Spec. der Nierenphosphatase. Bioch. Zs., **258**, 360 (1933). S.A. — 174) ***M. Ichihara,*** Phosphamidase. Jl. of Biochem., **18**, 87 (1933). S.A.

Phosphaminase in Anspruch, ebenso ISHIHARA 174), der aber die natürlichen Substrate nicht untersucht, sondern an synthetischen Phosphamiden gearbeitet hat (s. u.). Für die natürlichen Substrate macht der Umstand weiterhin bedenklich, daß sie an sich sehr leicht in wäss. Lösung zerfallen, also vielleicht garkeines Enzyms für diese einfache Hydrolyse bedürfen, die wie gesagt biologisch wohl garnicht in Betracht kommt.

Es seien also nur ganz kurz die Substrate und einige Eigenschaften der fraglichen Fermente hier angegeben. Die natürlichen Substrate sind die beiden **Phosphagene,** die im Tätigkeitsstoffwechsel des Muskels unentbehrlichen Stoffe Kreatin-PhS (I) und (bei Wirbellosen) Arginin-PhS (II), über die NACHMANSOHN 175) und BALDWIN 176) zusammenfassend berichtet haben. Ihre Formeln sind:

Es ist also der Stickstoff direkt an das P gebunden.

Zur Entdeckungsgeschichte dieser Stoffe sei ganz kurz berichtet: Die beiden EGGLETON's 177, 178) fanden im Muskel der Wirbeltiere eine säurelabile PhS-Verbindung, die bei der Tätigkeit aufgespalten wird; von ihnen wurde der Name Phosphagen eingeführt. Unabhängig davon fanden FISKE und SUBBAROW 179), daß der größte Teil des sog. „anorganischen P" im Warmblütermuskel locker an Kreatin gebunden ist. Sie konnten dieses Phosphagen rein darstellen, sowie zeigen, daß es bei der Kontraktion zerfällt und bei der Erholung wieder aufgebaut wird. Da die EGGLETON's das Phosphagen bei Wirbellosen nicht fanden, seine Funktion aber generell wichtig zu sein schien, so suchten MEYERHOF und LOHMANN 180) bei Wirbellosen nach einem Ersatz und fanden ihn in der völlig parallel wirkenden Arginin-PhS. Es gelang ihnen ferner die Reindarstellung und Strukturaufklärung beider Phosphagene. Methode der Reindarstellung über die Ba-Salze LOHMANN 181), als Ca-Salz der Kreatin-PhS FISKE 182); quantitative Bestimmung dieselben. Versuche der Synthese führten bisher nur zu Isomeren (ZEILE 182a)).

Muskelextrakte und Preßsäfte spalten, aufgekochte nicht. Im zellfreien Muskelsaft ist also jedenfalls ein Enzym enthalten, das glatt hydrolysirt. **ph-Optimum** ca. 6,7, bei 8,5 keine Wirkung, bei ca. 10 erfolgt Synthese (180).

Bei der Spaltung (mit Säure) fand BRAUNSTEIN 183) eine starke **mitogenetische Strahlung** mit 3 aktiven Banden bei 2000, 2100, 2150 Å.

---

175) ***D. Nachmansohn,*** Guanidinophosphorsäuren etc. Hb. der Bioch., 2 A. Erg. Band S. 162. Jena 1930. — 176) ***E. Baldwin,*** Phosphagen, Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., **8,** 74 (1933); BPh 72, 261. — 177) ***Ph. Eggleton, G. P. Eggleton,*** Inorg. phosphate and a labile form of organ. phosph. in the gastrocnemius etc. Biochem. Jl., **21,** 190 (1927). — 178) ***Dies.,*** Phys. signif. of phosphagen. Jl. of Phys., **63,** 155, **65,** 15 (1927/8). — 179) ***C. H. Fiske, Y. Subbarow,*** Nat. of the „inorg. phosph," in . . . muscle. Science, **65,** 401 (1927). — 180) ***O. Meyerhof, K. Lohmann,*** Natürl. Guanidinphosphors. etc. Bioch. Zs., **196,** 22, 49 (1928). — 181) ***K. Lohmann,*** Isol. versch. natürl. Phosphors.-Verbind. etc. Bioch. Zs., **194,** 306 (1928). — 182) ***C. H. Fiske, Y. Subbarow,*** Phosphocreatine. Jl. of biol. Chem., **81,** 629 (1929). — 182a) ***K. Zeile,*** Kreatin-Phosphors. Zs. phys. Chem. **236,** 263 (1935). — 183) ***A. E. Braunstein, B. A. Severin,*** Zerfall der Kreatin-PhS als mitogen. Strahlungsquelle. Bioch. Zs., **255,** 38 (1932).

Auf das Vorkommen der beiden Phosphagene sei nur ein flüchtiger Blick geworfen; es ist zwar biologisch überaus interessant, aber enzymtypisch ohne Belang, vgl. MEYERHOF **184)** und BALDWIN (l. c. 176). Arginin-PhS kommt bei Wirbeltieren einschließlich des *Amphioxus* nicht vor, wohl aber enthalten sie die Wirbellosen; bei einigen kommt aber daneben auch Kreatin-PhS vor, nämlich bei solchen Gruppen, die zu den Wirbeltieren überleiten, so bei Echinodermen und Enteropneusten (l. c. 176).

Beide Phosphagene kommen aber überhaupt nur in der quergestreiften Muskulatur, nicht in der glatten vor; und da außer bei den Arthropoden die allermeisten Muskeln glatt oder spiralfasrig sind, so fehlt Arginin-PhS meist, so in allen Tonusmuskeln; sie findet sich allerdings auch in einigen glatten Muskeln, die den quergestreiften anatomisch und funktionell ähnlich sind (Würmer, Mollusken, Echinodermen); ferner in den Beinmuskeln von Insekten **(185)**. Bei den Cephalopoden soll ein drittes Phosphagen vorkommen (nach BALDWIN).

Bei Wirbeltieren ist der Hauptfundort der Skelettmuskel, Herzmuskel enthält nur ca 1/10 der Menge; es fehlt in den Vorhofmuskeln ganz (MARTINO **186)**). Die Mengen in den einzelnen Muskeln sind verschieden, ebenso hängt im einzelnen Muskel der Gehalt mit dem Tätigkeitszustand zusammen; Training vermehrt, ebenso Curare, Skorbut vermindert etc. (Lit. bei **175)**). Bei Neugeborenen (Hund, Mensch) nur in den bereits zur Tätigkeit geeigneten Muskeln (Diaphragma, etc.) (SIRACUSA **187)**). Bei Fischen viel mehr in den Muskeln der lebhaften als der trägen Schwimmer (ZAGAMI **188)**); ebenso aber auch bei Warmblütern viel mehr in den „schnellen" als in den „trägen" Muskeln (MARTINO **189)**). Von glatten Muskeln ist es nach ZANGHI **190)** in der des Magens in geringer Menge vorhanden. In der Speicheldrüse ROSSI **191)**. Eine leicht spaltbare, aber noch nicht identificirte PhS-Verbindung fand v. EULER **192)** in der Hefe. Eine Synthese von Phosphagen durch Hefenenzyme findet aber nicht statt.

Die oben erwähnte Synthese der Kreatin-PhS aus Phospho-brenztraubensäure + Kreatin läßt sich in allen Organen außer roten BK nachweisen, nach dem Muskel wirkt Hoden am stärksten (TORRES **193)**), und zwar kommt dies auf Rechnung der Spermatozoen.

Blut enthält in der Norm kein Phosphagen, wohl aber nach Aufnahme von Kreatin oder Kreatinin (ABDON **194)**).

Auf die Rolle, welche die Phosphagene im Muskel spielen, ist hier nicht einzugehen. Ihr Zusammenhang mit den Vorgängen der Erregung, speciell der Chronaxie, und der Kontraktion gehört überhaupt nicht in dieses Werk, und ihr inniges Zusammenwirken mit den rein chemischen Umsetzungen, die der Muskelarbeit zu grunde liegen, ist nicht zu trennen von der Besprechung der Hauptabbauvorgänge an den Zuckern, die ja letzten Endes das Material liefern. Soweit wir also nicht schon auf diese Zusammenhänge S. 110 hingedeutet haben, werden wir bei dem Kap. Abbau der Zucker darauf zurückkommen.

Ganz unabhängig von diesen weittragenden Arbeiten, die aber enzymtypisch nicht viel ergeben haben, hat nun ISHIHARA (l. c. 174) das fragliche Ferment Phosphaminase an **synthe-**

---

184) ***O. Meyerhof,*** Verbreit. der Argininphosphors. in der Muskul. der Wirbellosen. Arch. di Sci. biol., **12,** 536 (1928). S.A. — 185) ***N. A. Verjbinskaja, K. M. Steinhart,*** Natur etc. des Phosphagens. Fiziol. Ž., **18,** 360 (1935) (russ.); BPh 88, 387. — 186) ***G. Martino,*** Pres. di fosfogeno nel cuore. Boll. Soc. Ital. Biol., **2,** 1019 (1928); BPh **45,** 808. — 187) ***V. Siracusa,*** Pres. di fosfog. nei neonati etc. ibid., **4,** 727 (1929); BPh **53,** 339. — 188) ***V. Zagami,*** Fosfog. muscol. nei pesci. Atti Acc. Lincei VI, **10,** 599 (1929). — 189) ***G. Martino,*** Conten. in fosfog. di muscoli striati etc. ibid., **7,** 79 (1928). — 190) ***G. Zanghi,*** Pres. di fosfog. nei muscoli lissi. Boll. Soc. Ital. Biol., **4,** 719 (1929); BPh **53,** 340; Arch. di fis., **28,** 372 (1930); BPh **57,** 566. — 191) ***A. Rossi, G. Scoz,*** Pres. di un comp. org. fosf. . . . nella ghiand. sottomascellare. Atti Acc. Lincei VI, **14,** 582 (1931). — 192) ***H. v. Euler, R. Nilsson,*** Leicht spaltbare Phosphors.-Verb. in der Hefe. Zs. phys. Chem., **195,** 273 (1931). — 193) ***J. Torres,*** Kreatinphosphors.-Synth. in Organextrakten und . . . Spermatozoen. Bioch. Zs., **283,** 128 (1935). S.A. — 194) ***N.-O. Abdon,*** Prés. de la phosphagène dans le sang après l'admin. de créatine etc. Kgl. Fysiogr. Sällsk. Lund Förh. **5,** H. 14 (1935). S.A.

tischen Substraten untersucht. Er stützt sich auf die Ergebnisse der Schule AKAMATSU, die verschiedene Typen verschiedener Arten von Phosphatasen unterscheidet, nämlich Mono-Esterasen, Di-Esterasen, Pyrophosphatasen in je 3 Typen von verschiedenem opt. ph etc., wie wir dort eingehend besprochen haben. ISHIHARA will nun dementsprechend wieder 3 Typen von Phosphaminasen aufgedeckt haben. Als Substrate verwendet er die einfache Amino-PhS $H_2N — PO(OH)_2$, die Diaminophosphorsäure (er nennt sie weniger gut Phosphorsäure-mono-und-di-amid), den Amino-PhS-Phenylester $H_2N — PO<^{OC_6H_5}_{OH}$, Phenylamino-PhS $C_6H_5NH — PO(OH)_2$, etc. Auch diese Substrate zeigen an sich den Zerfall der P—N-Bindung bei wachsender Acidität, es konnte also bei saurem ph nur die Differenz, dh. die Mehrspaltung durch das Enzym beobachtet werden. Als Typen dienten wie stets die Enzyme aus Niere (ph = 9), Taka (3,2), Reiskleie (5,5). Alle 3 greifen die Substrate an, meist zeigen sich auch hier die doppelten ph-Optima wie gegenüber den Substraten der Phosphatasewirkung. Die Optima sind für die einzelnen Substrate leicht verschieden. Phenyl-amino-PhS zerfällt bei saurer R. zu schnell von selbst, bei alkal. R. wird sie nicht desaminirt. Das beste Objekt ist die stabile Chlor-phenylamino-PhS, $Cl \cdot C_6H_4 NH — PO(OH)_2$. Trennung der Phosphaminase von Phosphatase gelang aus Nierenferment durch Adsorption an Kaolin oder Tonerde C_γ, aber nur teilweise: es wird die ganze Phosphatase und ein Teil der Phosphaminase adsorbirt. $Fe(OH)_3$ adsorbirt die Phosphaminase selektiv; WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 173) fand für sein Enzym (Niere, Kreatin-PhS) das genaue Gegenteil, starke Anreicherung der Phosphaminase durch $Fe(OH)_3$. Die Spaltung von Kreatin-PhS durch Nierenferment wird durch Sulfhydryl nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **195)** stark gehemmt.

Diese ganze Unterscheidung eines besonderen Fermentes in 3 Typen steht und fällt mit der Lehre AKAMATSU's überhaupt. Da diese z.B. in wichtigen Punkten umstritten ist, so wird man ein Urteil auch über diesen Specialfall vertagen müssen, bis die ganze Sache geklärt ist. Ein endgiltiger Beweis für die Existenz einer besonderen Phosphaminase scheint mir auch für die synthetischen Substrate noch nicht geliefert zu sein.

---

195) ***E. Waldschmidt-Leitz* c.s.,** Einfl. von SH-Verbind. auf enzym. Proz. Zs. phys. Chem. **214**, 75 (1933). S.A.

B. Acylamidasen.

I. Spaltung von Mono-acylamiden.

1) Einfache Säureamide, Asparagin.

§ 443. In dieses Gebiet ist auch heute noch keine Ordnung hereinzubringen. Es gibt zweifellos ein specifisches Enzym, das Asparagin an der Amidbindung aufspaltet und eins, das auf das homologe Glutamin wirkt; diese Enzyme sind sicherlich ebenso verschieden von allen Peptidasen, wie von den substituirte Säureamide vom Typus des Benzoyl-glycins spaltenden Enzymen; sie sind aber nach GRASSMANN **1)** auch verschieden von den Enzymen, die man annehmen muß, um die immer wieder berichteten Hydrolysen einfacher Säureamide zu erklären.

Ob **einfache Amide der Fettsäuren**, sowie Benzamid u. dgl. durch Enzyme der tierischen Gewebe und der Schimmelpilze gespalten werden (H.W. S. 780), ist immer noch nicht sichergestellt.

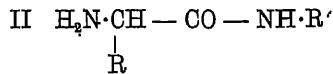
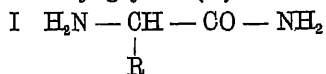
Von Präparaten der ereptischen Enzyme werden sie sicherlich nicht angegriffen (GRASSMANN **2**)), auch nicht von echten Hefen; wohl aber von *Torula utilis* (GORR **3**)). Diese spaltet Acetamid, Propionamid, Lactamid, andere nicht. (Auch Harnstoff und Hippursäure werden nicht angegriffen.) Die bei tierischen Geweben gefundenen Spaltungen waren doch wohl bakterieller Natur. Auch die Asparaginase-präparate aus Schimmelpilzen von SCHMALFUSS (l. c. 25) greifen Acetamid und Oxamid nicht an.

Die Bildung dieser Amidasen ist nach GORR weitgehend vom Nährboden der *Torula* abhängig. Auf Ammonsulfat Null, Asparaginsäure schwach, andere Aminosäuren besser, sehr reichlich auf Ü und Acetamid.

Aminosäuren-amidase. Dagegen findet sich in beinahe allen Organextrakten, auch in rohen Erepsin-präparaten **(3a)** und in der Polypeptidase der Hefen **(4)** ein Enzym, das Amide von echten Aminosäuren an der Amidbindung aufspaltet, d. h. wenn die Aminogruppe vorschriftsmäßig in α-Stellung steht. Das Enzym spaltet weder nicht mit NH_2 substituirte Fettsäureamide, noch β-Aminobuttersäure-amid **(2, 3a)**.

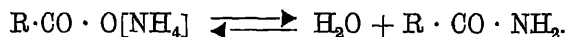
Adaequate Substrate sind z. B. Amide der normalen einbasischen α-Aminosäuren vom Typus I, so Leucinamid **(4, 5)**, ferner decarboxylirte Dipeptide vom Typus II, wie z. B. Leucyl-decarboxy-glycin **(6)**.

$$\text{I}\quad H_2N-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-CO-NH_2 \qquad\qquad \text{II}\quad H_2N\cdot\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-CO-NH\cdot R'$$

---

1) ***W. Graßmann,*** Amidasen. Hb. der Biochem., Erg. Werk, Bd. I, S. 460. Jena 1933. — 2) ***W. Graßmann, O. Mayr,*** Hefeasparaginase. Zs. phys. Chem., **214,** 185 (1933). — 3) ***G. Gorr, J. Wagner,*** Amidspaltg. der Hefen. Bioch. Zs., **254,** 1 (1932), **266,** 96 (1933). S.A. — 3a) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann, A. Schäffner,*** Spaltbark. substit. Aminosäuren-amide. Ber. Chem. Ges., **60,** 359 (1927). S.A. — 4) ***W. Graßmann,*** Spec. der Hefepeptidasen. Ber. Chem. Ges., **61,** 656 (1928). — 5) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls,*** Aminopolypeptidase aus Darmschl. Ber. Chem. Ges., **63,** 1203 (1930). — 6) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Cleav. of leucyl-decarboxy-glycine. C. R. Lab. Carlsb., **19,** Nr. 3 (1931). S.A.

Die Notwendigkeit der typisch in α-Stellung stehenden Aminogruppe weist auf einen inneren Zusammenhang mit den Dipeptidasen oder Amino-polypeptidasen hin; es ist indessen noch nicht aufgeklärt, ob hier eine Nebenwirkung eines dieser Enzyme vorliegt oder ein eigenes specifisch eingestelltes Enzym.

Die biologische Bedeutung dieser noch kaum bekannten Enzyme, wenn sie als eigene Enzyme überhaupt existiren, dürfte weniger in der Fähigkeit zur hydrolytischen Zerlegung dieser ja unbiologischen Substrate zu suchen sein, als in der Synthese solcher Amide, da diese Reaktion, wenn sie als an den Ammonsalzen sich abspielend geschrieben wird, leicht umkehrbar erscheint:

$$R \cdot CO \cdot O[NH_4] \rightleftarrows H_2O + R \cdot CO \cdot NH_2.$$

Auf diese Möglichkeit, daß es sich um eine enzymatische Amidbildung aus Ammonsalzen durch eine reversibel wirkende „Hydratase" handeln könne, hat m. W. zuerst v. EULER 7) hingewiesen; es gilt dies nach den neuesten Befunden von KREBS 8) ganz besonders für Glutamin (s. u.), dagegen anscheinend nicht für Asparagin.

Einer solchen biologischen Amidbildung entspricht die Theorie von BLISS 9), der annimmt, daß das im Stoffwechsel gebildete NH_3 zunächst durch Bindung an „Eiweiß" (wohl eher Eiweißabbauprodukte) intermediär entgiftet und in dieser Amidform zur Niere hingebracht wird, die dann das NH_3 endgiltig zur Ausscheidung im Harn freisetzt. In die Femoralvene injicirte Ammonsalze steigern den Amidgehalt des Blutes und den NH_3-Gehalt des Harns; ebenso steigt der Amidgehalt des Blutes parallel mit der NH_3-Ausscheidung. Es muß freilich bei diesen Überlegungen der BLISS noch nicht bekannte Umstand berücksichtigt werden, daß nach KREBS die Niere auch in erheblichem Umfange Aminosäuren selbst desaminirt. Auch wird nach seinen neuesten Befunden NH_3 nicht generell an „Eiweiß", sondern nur an Glutaminsäure gebunden (s. u.).

Asparaginase. Diesen unklaren Dingen gegenüber scheint nun die Asparaginase wirklich ein specifisches Enzym zu sein, wie wir schon im H.W. S. 780 angeben konnten. Es ist sogar sehr wahrscheinlich, daß es ganz streng specifisch ist, und sogar auf Glutamin ein Specialferment wirkt (8). Das Diamid der Asparaginsäure wird halbseitig angegriffen (2).

Die Besonderheit der Affinität scheint damit zusammenzuhängen, daß nicht wie bei den spaltbaren Amiden der einfachen Aminosäuren die NH_2-Gruppe in α-Stellung steht, sondern in β; jedenfalls ist die A. verschieden von den „α-Aminosäure-amidasen".

$$\begin{array}{l} CO - NH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ H_2N \cdot CH \\ | \\ COOH \end{array}$$

Asparagin

Dafür spricht auch, daß α-Asparagin unangreifbar ist. Unspaltbar sind ferner der optische Antipode des natürlichen l-Asparagin, das d-β-Asparagin (GROVER 10)), das decarboxylirte Asparagin = β-Aminopropion-amid; und das der Aminogruppe beraubte, also Succino-mono-amid, ferner die Amide der Oxy-asparaginsäure nach CHIBNALL 11). Auch Substitutionen in das Amid (Chloracetyl-, Glycyl- etc.) heben die Spaltbarkeit auf, hier liegt also der Trennungsstrich gegenüber den „Acylasen" (§ 444). Mit Proteasen resp. Peptidasen hat das Enzym nichts zu tun. Da beim Abbau von Edestin mit Pepsin, Trypsin und Dipeptidase Asparagin erhalten bleibt, sind diese Präparate frei von A. (DAMODARAN 12)); auch gereinigte Dipeptidase und Aminopolypeptidase sind auf

---

7) ***H. v. Euler, K. Myrbäck,*** Chemie der Enzyme II, 2; 2. u. 3. Aufl. München, 1927, S. 375. — 8) ***H. A. Krebs,*** Synth. of glutamine etc. Biochem. Jl., 29, 1951 (1935). S.A. — 9) ***S. Bliss,*** Amido nitrogene of blood. Jl. of Pharm., 40, 171 (1930). — 10) ***C. E. Grover, A. Ch. Chibnall,*** Enz. desamid. of asparagine in the higher plants. Biochem. Jl., 21, 857 (1927). — 11) ***A. Ch. Chibnall, R. K. Cannan,*** Synth. of the i-hydroxyasparag. Biochem. Jl., 24, 945 (1930). — 12) ***M. Damodaran,*** Isol. of asparagine from an enz. dig. of edestin. Biochem. Jl., 26, 235 (1932).

Asparagin ohne Wirkung. In derselben Weise lieferte Gliadin unversehrtes Glutamin (12a).

Der Umstand, daß gereinigte A. bei Gegenwart von Pyrophosphat Glutamin nicht angreift, wohl aber frische Autolysate von Hefe, spricht für die Sonderexistenz einer Glutaminase (2), die nun inzwischen sehr wahrscheinlich geworden ist (KREBS 8)).

Dagegen soll nach SUZUKI **12b)** Asp. aus Leber auch Glycyl-asparagin spalten, sowie das Amid der Pyrrolidon-carbonsäure und (bei ph 7,4) Glucosamin; jedoch zweifelt er selbst daran, daß diese Wirkungen der A. selbst zuzuschreiben sind.

Eine durchgreifende Reinigung der A. liegt noch nicht vor; immerhin konnten GRASSMANN und MAYR (l. c. 2) eine von Dipeptidase völlig freie, vielleicht noch geringe Mengen Aminopolypeptidase enthaltende A. gewinnen.

Autolyse der Hefe bei ph = 8 mit Toluol oder Diammon-phosphat. Beim Stehen bei ph 8—9 verschwinden die Peptidasen; von Aminopolyp. auch Trennung durch Kaolin, das vorzugsweise die A. adsorbirt; Ausschaltung der Peptidasen auch durch Gifte (s. u.). Umgekehrt vernichtet Ausfällung mit Aceton die A. (GEDDES **13**)). Das tierische und pflanzliche Enzym zeigen keine wesentlichen Verschiedenheiten, wie an Hefe (l. c. 2, **13**)), Schimmelpilzen (l. c. 23), Gerste (GROVER **10**)), Leber (**13**), Bakterien (**14**) gezeigt wurde.

Der **opt. ph** ist etwa derselbe wie bei den Peptidasen, ca. = 8,0, auch bei tierischen Organen (**12b**) 8,1 gegenüber ca 7,5 (**15**); bei Gerste ca. 7,0 (**10**), bei Schimmelpilzen Werte von 7,6—8,6 (l. c. 24/5). Wirksam zwischen 5,5 und 10,3 (**13**). Sehr empfindlich gegen Alterung und gegen Säuren, sowie gegen organische Fällungsmittel (l. c. 25), ph = 5 vernichtet schon bei 0° sehr schnell (l. c. 2). Die Enzymgifte, vor allem HCN, H_2S, Pyrophosphat, hemmen kaum viel schwächer als bei den Peptidasen. Von Schwermetallsalzen hemmt nur Ag und Hg. Glutathion leicht hemmend (l. c. 2).

Kinetik (l. c. 2): annähernd linearer Verlauf (nach GEDDES Konstanten steigend), proportional der Enzymmenge, von Substratkonz. unabhängig bei 0,1—0,025 mol./l. **Einheit** die Enzymmenge, die 0,5 m Asparagin (66 mg) bei ph = 8 in Volum 10 ccm bei 40° in 2 h zu 50 % spaltet.

Vorkommen und Bedeutung. Die Asparaginase kann einerseits ein ganz normales Glied des enzymatischen Systems des Eiweißabbaus sein. Denn die oben erwähnten Versuche mit Pepsin und Trypsin an Edestin (**12**) und Gliadin (**12a**) haben gezeigt, daß ganz erhebliche Mengen an Asparagin resp. Glutamin hierbei entstehen, also im Eiweißmolekül vorgebildet sind, zum mindesten in den hier untersuchten pflanzlichen Proteinen. Zum Zweck des vorgeschriebenen Totalabbaus muß also noch die A. angreifen, um die endgiltige Freisetzung auch dieses Anteils an NH_3, z. B. für die Harnstoffsynthese etc. zu bewirken. CLEMENTI **17**) freilich bestreitet, daß beim Eiweißabbau überhaupt Asparagin entsteht. Dann würde auch für die Asparaginase nur die gänzlich andere biologische Funktion verbleiben, nämlich aus Ammonsalzen Amide synthetisch zu bilden (l. c. 7), worauf wir bei Glutaminase näher eingehen werden; es muß indessen gleich bemerkt werden, daß nach KREBS (l. c. 8) diese Funktion nur der Glutaminase, nicht der A. zuzukommen scheint, so daß die ganze Sachlage beim Asparagin erneuter Prüfung bedarf.

In Organen höherer Tiere wird das Enzym wohl überall zu finden sein; die Annahmen von CLEMENTI (*l. c. 8*) **16, 17**) betr. ihr sehr beschränktes Vorkommen (nur Vögel, Herbivoren

12a) ***M. Damodaran, G. Jaaback, A. Ch. Chibnall,*** Glutamin from an enzym. dig of gliadin. Biochem. Jl., **26**, 1704 (1932). — 12b) ***Y. Suzuki,*** Leberasparaginase. Jl. of Biochem. **23**, 57 (1936). S.A. — 13) ***W. F. Geddes, A. Hunter,*** Enzyme asparaginase. Jl. of biol. Chem., **77**, 197 (1928). — 14) ***A. I. Virtanen, J. Tarnanen,*** Enz. Spalt. . . . der Asparaginsäure. Bioch. Zs., **250**, 193 (1932). S.A. — 15) ***A. Clementi, P. Prampolini,*** Conc. idrog. opt. per. . . . asparaginasi anim. Boll. Soc. Ital. Biol., **4**, 200 (1929); Arch. di Sci. Biol., **13**, 443 (1929); BPh **51**, 792, **52**, 484. — 16) ***A. Clementi,*** Signif. fis. d. . . . asparaginasi nell org. animale. Arch. di farm., **41**, 241 (1926). — 17) ***A. Clementi, D. Torrisi,*** Assenza di asparagina . . . d. idrol. enz. d. proteine. Boll. Soc. Ital. Biol., **5**, 956 (1930); BPh **60**, 373.

und Omnivoren) ist in dieser Schärfe nicht wahrscheinlich. Damit auch nicht seine Theorie, daß A. als Anpassung an die pflanzliche Nahrung mit ihrem Asparagin-gehalt entstehen, und darin die bessere Verwertung des Asparagins bei solchen Tieren beruhen soll. So fand MIZUHARA **18)** A. in der Leber (absteigend) bei Kaninchen, Hahn, Schwein, Rind, Hund. Reihenfolge der Organe (Kaninchen) Leber, Muskel, Niere, Milz, Blut. Das Enzym kommt also zwar in geringerer Menge bei Carnivoren vor, fehlt aber nicht.

Die Hoden der Vögel sind nach CLEMENTI reich an A., aber nur bei ausgewachsenen Hähnen, bei jungen fehlt sie **(19)**; im Kalbshoden fehlt sie ebenfalls (MARIO **20)**) (Gegensatz zu älteren Angaben). Beim Fetus (Mensch) vom 3. Monat an, Leber, Darm, besonders Niere (ABE **21)**); auch beim Embryo des Huhns **(19)**. Im Sarkom (Kaninchen) zweifelhafte Wirkung **(18)**, bei den Tieren selbst bei Kachexie in der Leber vermindert.

Eine Nachprüfung der Angaben CLEMENTI's bzgl. Fehlen bei Kaltblütern und Wirbellosen liegt nicht vor.

In Pflanzen kommt A. ebenfalls vor, so in Gerstensamen (GROVER, l. c. 10). Weitere Untersuchungen liegen nicht vor.

Das Vorkommen in der Hefe ist von GEDDES (l. c. 13) und GRASSMANN (l. c. 2) endgiltig erwiesen worden. GORR c. s. **22)** fanden bei *Torula utilis* eine starke Abhängigkeit vom Nährboden, von dessen Gehalt an Aminosäuren (Abb. 58). Auf Neubildung von Aminosäuren aus Eiweiß beim Trocknen führen sie auch die erhebliche Steigerung des Gehalts an A. zurück.

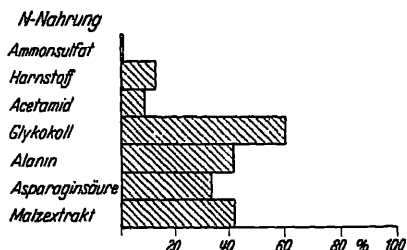



Abb. 58. Asparaginspaltung durch *Torula* in %; nach 22).

Die A. von *Aspergillus niger* (*l. c. 21, 22*) ist von BACH **23/4)** und SCHMALFUSS **25)** näher untersucht worden. BACH fand einen opt. ph von 8,4—8,6. Temp. Opt. abhängig vom ph, d. h. bei 7,6 wird es bei 40° schon schnell geschwächt. Die Spaltung ist wegen schneller Enzymzerstörung unvollständig, nach 21 h nur 40 %. Das Enzym bildet sich auf jedem Nährboden. Gehalt bei Beginn der Kultur am größten, dann abfallend, dann zweites Maximum, wenn das Nährmedium erschöpft ist, mit dem Eiweißzerfall. Keine Sekretion nach außen, auch nach Zerreiben der Kultur bleibt das Enzym an geformten Teilchen haften. SCHMALFUSS c. s. **25)** erhielten ein wirksames Enzym durch Extraktion mit Wasser und Glycerol; Eigenschaften die gleichen wie oben angegeben. Opt. ph > 7.6. Es entsteht auch bei der Kultur auf anorg. Stickstoff.

Glutaminase. Die Idee v. EULER's (l. c. 7), daß die Amidasen mindestens teilweise in der Art wirken, daß sie nicht vorwiegend Amide spalten, sondern sie aus den Ammonsalzen durch Wasserabspaltung bilden, also in analoger Weise wie die Fumarase eine reversible Wasseranlagerung katalysiren, ist nunmehr in einer sorgfältigen Untersuchung von KREBS (l. c. 8) experimentell gestützt worden.

Er fand, daß Nieren (Schnitte) Glutaminsäure oxydiren, ohne daß dabei NH_3 frei wird, — im strikten Gegensatz zu der von ihm bearbeiteten oxydativen Desaminirung aller anderen α-Aminosäuren. Durch Vergiftung mit As_2O_3 ließ sich zeigen, daß primär NH_3 entsteht, aber

18) ***Sh. Mizuhara***, Desamidase. — Asp. bei path. Fällen. Jap. Jl. Obst., **12**, 296, 308 (1929); BPh **56**, 53. — 19) ***S. Impallomeni***, Pres. d. asparaginasi n. org. sessuali. Genesis, **11**, 43 (1931); BPh **65**, 132. — 20) ***M. Mario***, Ric. dell asparaginasi nei test. di vitello. Arch. di Farm., **41**, 216 (1926). — 21) ***M. Abe***, Desamidase in . . . human fetus etc. Jap. Jl. Obst., **13**, 456 (1930); BPh **58**, 780. — 22) ***G. Gorr***, ***J. Wagner***, Amidspalt. der Torula etc. Bioch. Zs., **266**, 96 (1933). S.A. — 23) ***D. Bach***, Act. de l'asparaginase de l'asp. niger. C. R., **187**, 955; Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 119 (1929). — 24) ***Ders.***, Évol. de l'asparaginase dans les cult. de l'asp. niger. Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 995, 1016 (1929). — 25) ***K. Schmalfuß***, ***K. Mothes***, Ferm. Desamid. durch Asp. niger. Bioch. Zs., **221**, 134 (1930).

in einer zweiten As-empfindlichen Reaktion wieder gebunden wird. Es wird sogar noch zugesetztes NH_3 verbraucht, aber nur bei Gegenwart von l(+)-Glutaminsäure; weder d(—)-Glutaminsäure noch Asparaginsäure verbrauchen NH_3. Dabei entsteht Glutamin, und zwar bildet sich dies sowohl aus zugesetztem NH_3 wie auch derart, daß ein Teil der Glutaminsäure desaminirt, und auch dies NH_3 zur Synthese herangezogen wird. Ohne Zusatz von NH_3 verlaufen die beiden Prozesse, Desaminirung und Synthese, verschieden schnell. Bei *Cavia* und Kaninchen ist die Synthese schneller, freies NH_3 tritt also nicht auf; bei Ratte und Schaf ist die Desaminirung schneller, so daß neben Glutamin auch freies NH_3 auftritt. Schwein, Hund und Katze bilden überhaupt kein Glutamin. (Es ist also auch dieses System im Sinne CLEMENTI's, l. c. 16, nur bei Herbivoren zu finden.)

Von anderen Geweben bilden nur noch Retina und Hirnrinde Glutamin, und zwar sehr erheblich; ein Teil des Glutamins verschwindet wieder in einer bisher unbekannten Reaktion ohne Bildung von NH_3. Alle anderen Gewebe, einschl. Leber, BK und Tumoren bilden kein Amid-N aus Glutaminsäure.

Die Synthese hat einen **opt. ph** von 7,2—7,4, sie verläuft bei Niere nur bei Überschuß von Glutaminsäure, bei Retina etc. auch bei Überschuß von NH_3. Glucose befördert nur bei Retina etc. Zerriebene Organe und Extrakte zeigen keine Synthese. Sie ist also abhängig von der normalen Zellstruktur, vom intakten Atmungsvorgang. Niere bildet anoxybiontisch kein Glutamin, HCN hemmt parallel zur Atmungshemmung. Bei Retina und Hirnrinde kann der starke anoxybiontische Stoffwechsel (Milchsäure) die zu der endothermen Synthese nötige Energie liefern. Retina vom Schwein liefert aerob > anaerob, da sie eine starke Atmung hat, bei der Taubennetzhaut, die kaum atmet, ist die Wirkung aerob nicht stärker als anaerob.

d-Glutaminsäure hemmt durch Ablenkung des Enzyms, Ketoglutarsäure und Asparaginsäure sind ohne Einfluß.

Es gibt also ein von allen Beziehungen zur Asparaginase völlig losgelöstes System einer Glutaminase, die dann vorwiegend synthetisch arbeitet, wenn sie unmittelbar gekoppelt ist mit einer energieliefernden Zellreaktion. Löst man das Enzym aus dieser Bindung, also in Extrakten, so tritt die rein hydrolytische Wirkung hervor; das Enzym spaltet dann Glutamin in NH_3 + Glutaminsäure. Auch dann ist das Enzym noch specifisch, nicht identisch mit der Asparaginase. Dies geht aus der relativen Wirkungsstärke hervor: $\frac{\text{Asparaginase}}{\text{Glutaminase}}$ bei Niere 1 : 100, bei Leber 1 : 4.

Das Enzym greift langsam Isoglutamin an, nicht Asparagin, Benzoylglutamin und Dipeptide mit Glutaminsäure. Die entstehende Glutaminsäure wirkt stark hemmend, was auf eine starke Affinität des Enzyms zur Glutaminsäure deutet (bei Asparaginase fehlt dies). d-Glutaminsäure hemmt Hydrolyse wie Synthese gleichmäßig.

Das Enzym in hydrolytischer Wirkung findet sich auch in anderen Geweben (Milz, Leber von *Cavia* u. a.). Da dieses Leberenzym von Glutaminsäure nicht gehemmt wird und auch ein anderes **ph-Opt.** hat, so gibt es mehrere Typen von Glutaminase, denn auch die nicht synthetisirende und nicht durch Glutaminsäure gehemmte ist nicht Asparaginase. Gehirn-Glutaminase hat den ph = 7,5 wie bei der Synthese, Leber-glutaminase bei 8,8 (Abb. 59).

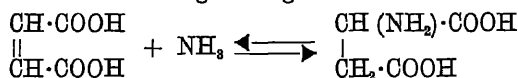
Abb. 59. p_H-curve of brain and liver glutaminase (nach 8).

Diese Befunde werfen ein ganz neues Licht auf das so viel bearbeitete Problem der postmortalen Ammoniakbildung in den Geweben. Die alte

Annahme, daß — neben anderen Quellen, bes. den Purinen — auch Säureamide und speciell Glutamin als Vorstufen in Frage kommen, ist damit gesichert. Aber es ist nicht mehr zulässig, nur die präformirten Amide der Proteine als Vorstufe anzusehen; es treten viel mehr die Amide, speciell das Glutamin, als zum besonderen Zweck synthetisirte Vorstufen in ein ganz neues Licht. Sie bilden auch Reserven für das im Zellstoffwechsel so vielfach wichtige NH_3, wie dies BLISS (l. c. 9) tatsächlich angenommen hatte. Daß Asparagin bei Tieren anscheinend durchaus nicht diese Funktion hat, macht die Sache nur noch interessanter. Auch die Tatsache, daß viele Gewebe erst beim Zerstören der Struktur, bzw. Absterben resp. Autolyse NH_3 abgeben, wird durch diese Befunde der Reaktionsumkehr mit der Aufhebung der Atmung voll aufgeklärt. Jedenfalls können also Amide auch im tierischen Stoffwechsel als NH_3-Reserven gebildet werden, wie dies für den pflanzlichen ja bereits bekannt ist (vgl. l. c. 25).

Die Befunde haben aber auch ein weitgehendes allgemeines Interesse, indem sie an einem leicht meßbaren Vorgang zeigen, wie dasselbe Enzym auch einen mit erheblicher Potentialdifferenz verlaufenden Vorgang nach beiden Richtungen katalysiren kann; einmal rein hydrolytisch, wenn es frei losgelöst ist, und einmal synthetisch, wenn es mit einem zweiten stark Energie abgebenden katalytischen Vorgang, der Zellatmung, durch gemeinsame Bindung an die Zellstruktur gekoppelt ist. Eine Würdigung dieser Sachlage muß natürlich dem „Allg. Teil" vorbehalten bleiben.

Anhang: Aspartase. Wir erwähnten bereits § 432, daß im Anschluß an die Asparaginase ein Enzym zu besprechen ist, das bisher im System überhaupt nicht unterzubringen ist. Dem Reaktionstypus nach erinnert die Aspartase an die reversible Wasseranlagerungen an ungesättigte Bindungen zwischen Kohlenstoffen katalysirenden „Hydratasen" und speciell an die Fumarase. Nur wird hier nicht an Fumarsäure H und OH zu Äpfelsäure angelagert, sondern $NH_2 + H$ nach der Reaktionsgleichung

$$\begin{matrix} CH\cdot COOH \\ \| \\ CH\cdot COOH \end{matrix} + NH_3 \rightleftarrows \begin{matrix} CH(NH_2)\cdot COOH \\ | \\ CH_2\cdot COOH \end{matrix}$$

Es bildet sich also ein enzymatisches Gleichgewicht aus zwischen Fumarsäure und Asparaginsäure (Abb. 60). Es ist also, wenn man will, eine Art anaerober Desaminirung, und deshalb

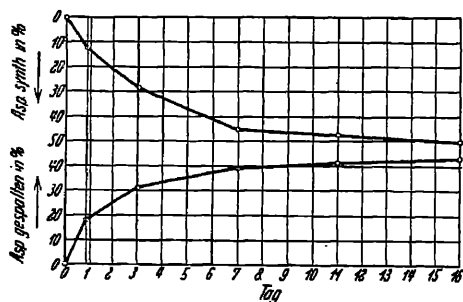



Abb. 60.
Das Gleichgewicht der Synthese und Spaltung der Asparaginsäure. Bei der Synthese 1 Mol Fumarsäure + 1 Mol Ammoniak; nach 27).

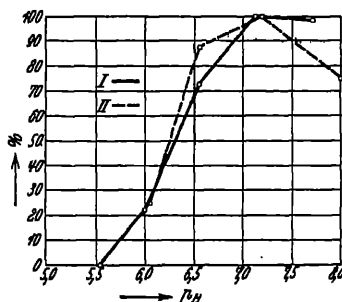



Abb. 61.
Die ph-Kurven für die Spaltung und Synthese der Asparaginsäure. I. Spaltung. II. Synthese; nach 27).

sei das Enzym ganz provisorisch hier untergebracht. Der Vorgang verläuft nach der Endschreibung ohne Anteilnahme von Wasser; selbstverständlich gibt dies nicht den wahren

---

26) ***J. H. Quastel, B. Woolf,*** Equil. betw. l-aspart., fumar. acid and ammonia etc. Biochem. Jl., **20**, 545 (1926), **23**, 472 (1929). — 27) ***A. I. Virtanen, J. Tarnanen,*** Enz. Spalt. und Synth. der Asparaginsäure. Bioch. Zs., **250**, 193 (1932). S.A.

Reaktionsvorgang wieder, da ja in wässeriger Lösung kaum mit einem Reagiren von NH_3 gerechnet werden kann; aber der wahre Verlauf ist nicht bekannt.

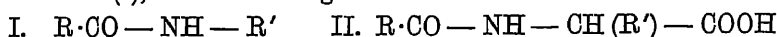
Das Enzym wurde zuerst beobachtet an „*resting bacteria*" von QUASTEL c. s. **26)**, indem sie diese Gleichgewichte auffanden. Das Enzym als solches ist dann von VIRTANEN **27)** genauer untersucht worden. Es findet sich außer in Bakterien auch in höheren Pflanzen, fehlt in Hefen und Tiergeweben; wohl aber soll die Reaktion bei Durchströmung der Leber eintreten **(27a)**.

Darstellung des Enzyms aus *B. fluorescens liquef.* durch Toluolwasser. Das Enzym katalysirt die Reaktion mit einem deutlichen Gleichgewicht. Es ist absolut specifisch auf Asparaginsäure eingestellt, verwandte Stoffe werden nicht beeinflußt (Diamid der Fumarsäure, Mesaconsäure, Aconitsäure). **Opt. ph** = 7,1 (Abb. 61). Die Reaktion folgt dem Massengesetz; Gleichgewichts-Konstante = 3,54.

Die Bedeutung dieses Enzyms liegt wahrscheinlich auf dem Gebiete des synthetischen Aufbaus; es wäre der erste Fall, daß man einen typischen Aufbauvorgang unter rein enzymtypischen Bedingungen studiren könnte. Die nahe liegende Bildung von Glutaminsäure über Citronensäure—Aconitsäure—Glutaminsäure ist nicht wahrscheinlich, da das Enzym kein NH_3 an Aconitsäure anlagert.

2) Spaltung substituirter Säureamide, Acylasen.

§ 444. Mit dem Namen **Acylasen** hat ABDERHALDEN **28/9)** eine anscheinend aus mehreren Einzelfermenten bestehende Gruppe von Enzymen belegt, die dadurch charakterisirt sind, daß sie substituirte Säureamide spalten, also Stoffe von der allgemeinen Formel (I), wobei allerdings bisher meist nur solche Substrate als spaltbar

I. R·CO — NH — R′ II. R·CO — NH — CH (R′) — COOH

befunden worden sind, in denen R′ eine Carboxylgruppe enthält (II), d. h. also nur acylirte Aminosäuren. Diese Substrate unterscheiden sich von den echten Peptiden nur dadurch, daß der Acylrest keine Aminogruppe besitzt, es sind also „Desamino-peptide", die ähnlich wie die decarboxylirten Peptide (l. c. 6) zu ihrer Spaltung anderer Enzyme bedürfen, als die echten Peptide; denn diese Acylasen greifen echte Peptide nicht an, so z. B. eins, das im gereinigten Darm-erepsin vorkommt und Chlor-acetyl-alanin zerlegt; ein anderes, das Chloracetyl-o-nitranilin angreift (ABDERHALDEN **28, 29)**, BALLS **30)**). Diese Enzyme stehen also den Carboxypolypeptidasen sehr nahe, um so mehr als ihre Affinität sicherlich auch auf den Angriffspunkt dieser Enzymgruppe, d. h. auf die Aminosäure, nicht aber auf das Acyl an sich gerichtet ist; z. B. wird nach WALDSCHMIDT-LEITZ **30a)** die Chloracetyl-m-aminobenzoesäure von der pankreatischen Carboxypolyp. gespalten. Wir kommen dort auf weitere Einzelheiten zurück.

Es wird hier auch wohl sicherlich keine scharfe Gruppentrennung allgemein durchführbar sein. Man wird vielmehr annehmen dürfen, daß die Wirkung der Carboxy-polypeptidasen sich an solchen Stoffen mit stark wechselnder Intensität vollziehen wird, von Null bis zu normaler Spaltung, wie wir es in ähnlicher Weise ja bei den Derivaten der Oligosen etc. vorfinden. Und umgekehrt werden in einzelnen Fällen streng specifische Enzyme sich aus diesen Übergangsformen herausheben,

27a) ***K. P. Jacobsohn c.s.***, Synthèse de l'acide aspart. dans le foie. Soc. Biol. **120,** 33 (1935). S.A. — 28) ***E. Abderhalden c. s.***, Einheitl. des Erepsins etc. Ferm. F., **12,** 228, 376, 572 (1931). — 29) ***Dies.***, Ident. der Chloracetyl-leucin spalt. Kompon. der Erepsinlös. etc. ibid., **13,** 408 (1932). — 30) ***A. K. Balls, F. Köhler***, Neue prot. Wirk. von Darmschleimh. Ber. Chem. Ges., **64,** 383 (1931). — 30a) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls***, Ursachen ster. Auslese etc. (Proteasen) ibid., **64,** 45 (1931). S.A.

Abgeschlossen: 28. 8. 36. Ber. Phys. 91. H. 1/2.

wie es bei den einfachen Amiden für die Asparaginase und Glutaminase, und wie es bei der hier behandelten Gruppe für die Hippuricase gilt.

So können wir unter den Acylasen vorläufig zwei Gruppen unterscheiden: 1.) solche, die als Begleiter der secernirten Peptidasen in Pankreas und Darmschleimhaut auftreten und somit am ehesten als Carboxy-polypeptidasen mit abgewandelter relativer Specifität zu betrachten sind. Sie spalten allerlei Acylderivate von Tyrosin, Phenylalamin und Leucin, sowie wie bereits angegeben Chlor-acetyl-alanin. Eine gewisse Anreicherung dieser Acylase im Trypsin durch Adsorption mit $Fe(OH)_3$ ist ABDERHALDEN 28, III) gelungen. Inwieweit diese Gruppe auch in Zellfermenten, also vereint mit den Peptidasen der Kathepsine vorkommt, ist noch kaum bekannt. Bei diesen Organwirkungen ist alles noch unklar.

Eine weitere Verwickelung der Sachlage ist kürzlich dadurch erfolgt, daß BERGMANN **30a)** als Komponente des Papains eine ganz neuartige „Polypeptidase" aufgefunden hat, die wiederum zwischen den echten Peptidasen und diesen „Acylasen" steht. Ihr Characteristicum ist, daß sie zum Angriff auf Peptidbindungen weder eines freien Carboxyls, noch einer freien Aminogruppe bedarf, sondern ganz allein der Säureamidbindung als Angriffspunkt; und zwar müssen deren 2 benachbart sein. Darauf kommen wir im Einzelnen erst bei den Peptidasen zurück, sowie beim Papain; denn die besondere Wirkung dieser Enzymgruppe eröffnet nach BERGMANN die Möglichkeit, daß diese Wirkung des Papains (als Gesamtheit) nicht wie die anderer Proteinasen an freien polaren Gruppen, sondern an den Peptidbindungen selbst ansetzen kann, Hier interessirt nur. daß dieses Enzym benzoylirte oder sonst acylirte Polypeptide wie Carbobenzoxydi- (resp. tri- und tetra-)glycin angreift und Hippursäure resp. Carbobenzoxy-glycin frei setzt. Immer erfolgt die Spaltung direkt neben der Acylaminobindung. Andererseits führt dieses Enzym zu den einfachen Amidasen über, indem es sogar auf Hippuryl-amid wirkt und Hippursäure freisetzt, in komplicirteren Fällen an zwei Stellen wirkt; so wird aus α-Hippuryl-ε-carbo-benzoxy-lysinamid sowohl NH_3 wie Hippursäure abgespalten. Ein scharfe Disponirung aller dieser Enzymtypen ist garnicht möglich; es sind überall fließende Übergänge zwischen „Amidasen" und „Peptidasen" vorhanden.

Demgegenüber steht die **Hippuricase**, das längst bekannte **Histozym**, das hauptsächlich der Niere zukommt (H.W. S. 780). Ob das echte Histozym auch in anderen Organen vorkommt, ist unsicher, jedenfalls fehlt es in den Erepsinpräparaten im Gegensatz zu der anderen Gruppe; es soll aber nach So **31)** in Leber und Muskel zu finden sein; in der Placenta fehlt es nach ABE **31a)**.

Andererseits ist aber seine Specifität sehr schwierig zu umgrenzen, da es weder auf Benzoyl noch auf Glycin allein eingestellt ist. Man kann sich vorläufig — d. h. bis zu einer klaren präparativen Trennung der angenommenen beiden Gruppen resp. ihrer Einzelenzyme — nur so helfen, daß man das Nierenferment = Hippuricase setzt, und dessen Specifität untersucht. Nach MAZZA **32)** ist das Nierenferment schon deswegen von der Carboxy-polypeptidase streng getrennt, weil es keine freie COOH-Gruppe nötig hat; es spaltet auch die Ester, und zwar den des Acetyl-glycins am schnellsten.

Für diese Hippuricase ergibt sich, daß sie erstens Dipeptide nicht angreift, also keine

---

30a) ***M. Bergmann c.s.,*** Proteol. enz. VI—VIII. Jl. of biol. Chem. **111**, 225, 245, 659 (1935). — 31) ***T. So,*** Hydrol. der Benzoylderiv. der Aminos. durch Histozym. Jl. of Biochem., **12**, 107 (1930). S.A. — 31a) ***M. Abe,*** Placentar ferm. etc. Jap. Jl. Obst., **15**, 284 (1932); BPh **72**, 509. — 32) ***F. P. Mazza, L. Pannain,*** Mecc. di az. dell' istozima. Atti Acc. Lincei (VI), **19**, 97 (1934).

Peptidase ist (WILLSTÄTTER 33)), andererseits aber die Acylderivate von l-Aminosäuren spaltet (*l. c. 14*), die optischen Antipoden garnicht angreift (*l. c. 20, 20a*), ebensowenig die Derivate von β-Aminosäuren (*l. c. 14*). Umgekehrt wird nach GRIFFITH **34)** Hippursäure von den Gesamtenzymen des Dünndarmes (Einspritzung in eine isolirte Darmschlinge) nicht angegriffen, erst im Dickdarm durch Bakterien.

Von Benzoyl-verbindungen sind nach So **31)** die meisten spaltbar; schwer die der basischen Aminosäuren (die gegen andere Organextrakte ganz resistent sind), garnicht die von Asparagin- und Glutaminsäure, wohl aber Benzoyl-asparagin. Auch KIMURA (l. c. 39) fand die Acyle saurer Aminosäuren schwer spaltbar. Auch Acetyl-sarcosin wird nach MAZZA **32)** gespalten. Extrakte aus verschiedenen Schimmelpilzen spalten nach OTANI **32a)** Hippursäure und langsamer Benzoyl-glycyl-glycin, sehr schnell Benzoyl-d, l-leucyl-glycin, nicht die Derivate des Phenylalanins. Benzoyltyrosin wird nach So **31)** nur in der Schweineniere zerlegt. Die Spaltung von Dibenzoyl-tyrosin durch andere Organe (die schon SHIZUAKI **36)** gefunden hatte) ist nur einseitig, indem eine Esterase nur das Benzoyl am phenolischen OH ablöst.

Die Reversibilität des Vorganges (*l. c. 16*) hat BLAGOWESTSCHENSKI **37)** wieder untersucht. Er findet wieder wie schon ABELOUS (*l. c. 17*) Verschiebung des Gleichgewichtes nach der Synthese durch Oxydation von Benzylalkohol + Glycin (Energielieferung für einen endothermen Vorgang (?), vgl. KREBS, l. c. 8). Es ist dabei zu beachten, daß in Nierenbrei Benzoesäure auch an sich verschwindet, wahrscheinlich durch Oxydation (WAELSCH **37a)**).

Angeblich vom hydrolytischen Enzym verschiedene „Synthease" nur in der Niere QUICK **38)**, in anderen Organen ein wieder anderes Enzym der Synthese von Phenacetursäure. Keine Enzymversuche, sondern Rückschlüsse aus Fütterungsversuchen an nephrektomirten Hunden und Ratten.

Das Enzym der Spaltung von Acetyl- und Formyl-glycin ist (nach dem Vorkommen, nicht den Eigenschaften) von der Hippuricase verschieden (KIMURA **39)**), was MAZZA **32)** ablehnt. Die Spaltbarkeit ist nur verschieden groß: aliphatische > aromatische; abnehmend mit der stärkeren Negativität der Substituenten, von aromatischen am besten Phenyl-propionyl-glycin, am wenigsten Toluolsulfo-glycin.

Dagegen scheint die Spaltung von **Glykocholsäure** in der Niere durch die H. zu erfolgen (*l. c. 14*) (WILLSTÄTTER **33)**, GRASSMANN **40)**); Taurocholsäure wird viel schwerer angegriffen.

Kein anderer Organauszug ist wirksam, wie für Leber schon DOMENICO **41)** im Gegensatz zu ROSENTHAL **42)** angegeben hatte; dagegen fand MAZZA **43)** die Spaltung auch in der Leber, aber durch ein anderes Enzym, das nur freie Glykocholsäure, nicht wie echte H. auch den Methylester angreift. Trypsin wirkt nicht auf gepaarte Gallensäuren (v. BEZNÁK **44)**).

ph-Opt. nach So **31)** 6,8—7,0 für alle Substrate, für die gepaarten Gallensäuren 8,0, nach MAZZA (Leber) 6,0. Cystein und Oxydationsmittel hemmen **(37)**.

32a) ***H. Otani,*** Wirk. der Schimmelpilzferm. auf die Benzoylderiv. der Aminosäuren etc. Acta Schol. Med. Kyoto, **17,** 330 (1935). — 33) ***R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz*** (Hippuricase); unveröff. cit. n. l. c. 1, S. 465. — 34) ***W. H. Griffith, P. B. Cappel,*** Hydrol. of hippuric acid in the alim. canal etc. Jl. of biol. Chem., **66,** 683 (1925). — 36) ***T. Shizuaki,*** Histozym. Act. Schol. Med. Kyoto, **6,** 467 (1924); BPh **38,** 203. — 37) ***A. W. Blagowestschenski, K. A. Nikolaeff,*** Revers. der Wirk. des Histozyms. Bioch. Zs., **276,** 368 (1935). — 37a) ***H. Waelsch, G. Klepetar,*** Enzym. Umbau der Benzoesäure etc. Zs. phys. Chem., **236,** 92 (1935). — 38) ***A. J. Quick,*** Site of the synth. of hippur. acid etc. Jl. of biol. Chem., **96,** 73 (1932). — 39) ***H. Kimura,*** Ferm. Spalt. der Acetylderiv. etc. der Aminos. Jl. of Biochem., **10,** 207, 225 (1929). — 40) ***W. Graßmann, K. B. Basu,*** Enz. Spalt. gepaarter Gallens. Zs. phys. Chem., **198,** 247 (1931). S.A. — 41) ***C. Domenico,*** Az. enzim. del fegato . . . s. colitaurina etc. Arch. di Farm., **41,** 240 (1926). — 42) ***F. Rosenthal c. s.,*** Abbau der Gallensäuren im Organ. Arch. für exp. Path., **122,** 159 (1927). — 43) ***F. P. Mazza, G. Stolfi,*** Idrol. e sint. enz. d. ac. biliari etc. Arch. di Sci. Biol., **17,** 434 (1932). — 44) ***A. v. Beznák,*** Wirk. von Trypsin auf die gep. Gallens. Bioch. Zs., **210,** 261 (1929).

Nach WILLSTÄTTER 33) ist das Nierenenzym ein Desmo-enzym, aber nach der Tierart in ganz verschiedenem Ausmaß: Hund fast ganz Lyo, Pferd ganz Desmo; andere zeigen gemischten Typus.

Histozym in Kryptogamen ist längst bekannt. In Hefen fehlt es (l. c. 3). *Aspergillus oryzae* greift auch Glykocholsäure langsam an (GRASSMANN 40)). Herstellung von Histozympräparaten aus Taka durch Extraktion mit Phosphatpuffer bei ph = 8 (37).

Bakterien. Hippursäurespaltung durch die meisten Streptococcen, außer hämolytischen, fand REIS 45).

II. Urease.

1) Darstellung und Eigenschaften.

§ **445.** (*H.W.* § *438*). Ein den auf Monoamide wirkenden entsprechendes Ferment für die Diamide zweibasischer Säuren scheint es generell nicht zu geben. Soweit man solche Spaltungen geprüft hat, wie z. B. an Oxamid, erwiesen sich die Stoffe als enzymatisch unangreifbar. So bleibt nach wie vor die Urease mit ihrer sehr engen Specifität auf Harnstoff, $CO<^{NH_2}_{NH_2}$, der einzige Vertreter der Gruppe der Diamidasen.

Darstellung. Der wichtigste Fortschritt ist die Darstellung einer Urease, die als einheitliches Protein angesehen wird, durch SUMNER; darauf kommen wir § 446 im Zusammenhang zurück. Hier nur einige sonstige Daten:

HUMBERT 46) erhielt wirksame U. aus *Soja* und *Canavalia* (Jackbohne) durch Extraktion mit 25 %-igem Alkohol, Fällung mit starkem Alkohol. Verreiben mit Wasser, wieder Alkoholfällung, mehrfach wiederholen. — ZAKOWSKI 47) reinigt wäss. Extrakte (2 %) aus Sojamehl mit CO_2, verdünnt dann mit Aceton, fällt nun mit CO_2 das Enzym erst bei 35°, dann nochmals bei 10°. Für *Canavalia* nicht anwendbar. RUCHELMANN 48) fällt erst Eiweißballast mit HCl, dann das Enzym mit Alkohol.

Für praktische Zwecke (Ü-Bestimmung) genügt es nach KAY 49), das centrifugirte Extrakt aus Jackbohnen unter vermind. Druck auf 1/3 einzudampfen und mit Aceton zu fällen; Waschen mit Aceton liefert haltbares Pulver (1 g Mehl = 50 mg Pulver).

Aus *Aspergillus* erhielt BACH 49a) eine von Asparaginase freie U. durch Behandlung mit Aceton, das die Asparaginase zerstört.

Über die Extraktion des Enzyms aus den Amoebocyten von *Limulus* und die Bedeutung der Kationen dafür liegen Angaben von LOEB c.s. 50/1) vor. Erdalkalien wirken besser als Alkalien (als Chloride); Mg und Mn in der Mitte. Opt. Konz. bei einwertigen höher. Wasser und dreiwertige Kationen extrahiren garnicht. Anionen außer (unwirksamen) Sulfaten ohne Bedeutung. Kombinationen von Kationen wirken nicht einfach durch Addition. Es bestehen anscheinend direkte Beziehungen zwischen dem Enzym und den Kationen; ferner kommt noch eine rein schädliche Wirkung (bes. bei Schwermetallen, § 448) und eine osmotische dazu. Die zunächst entstandene Metallverbindung läßt sich durch ein anderes Kation zersetzen, so daß das Enzym dann einen anderen Charakter annimmt; dies geht aber nur beim *Limulus*-ferment.

Allmählich werden die primären Verbindungen verfestigt, so daß kein Austausch mehr gelingt. Es handelt sich wohl um Protein-Salz-Komplexe.

Reinigung gelingt in gewissen Grenzen durch Kaolin und Elution mit Soda (v.

---

45) ***J. Reis, A. Swensson,*** Hydrol. de l'ac. hippur. etc. par . . . streptoc. Soc. Biol., **107**, 647 (1931); BPh **64**, 183. — 46) ***G. Humbert,*** Prép. d'une uréase etc. Soc. Biol., **90**, 607 (1924); BPh **27**, 198. — 47) ***J. Zakowski,*** Rein. der Sojaurease etc. Zs. phys. Chem., **202**, 67 (1931). — 48) ***A. Ruchelmann,*** Abscheidung der Urease. Bioch. Zs., **247**, 89 (1932). — 49) ***W. W. Kay, M. A. H. Reid,*** Opt. buffer ph for hydrol. of urea by urease etc. Biochem. Jl., **28**, 1798 (1934). — 49a) ***D. Bach,*** Act. de l'uréase de l'Asp. niger. Soc. Biol., **100**, 831 (1929); BPh **51**, 328. — 50) ***L. Loeb, O. Bodansky (I. Lorberblatt) c. s.,*** Spec. of salts in the extraction of urease from the amoeboc. of Limulus. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **24**, 218 (1926). Jl. of Biol. Chem., **72**, 415, **78**, 417 (1928). — 51) ***L. Loeb, I. Lorberblatt,*** Spec. Wirk. von Metallsalzen auf . . . Urease etc. Bioch. Zs., **236**, 298 (1931), **244**, 222 (1932).

Euler 52)), bestätigt von Jacoby 56)); weitergehende Reinigung nach dem ersten Verfahren von Sumner (l. c. 73) führt zu 160facher, Adsorptionsversuche von Waldschmidt-Leitz 53) zu 180facher Wirkung. Adsorption der Soja-Urease durch Tonerde C_γ in neutralem Phosphatpuffer und Ausfällung durch gereinigte Antiurease (§ 449) aus *Canavalia* führt zu einer Wirkungssteigerung auf das 850fache (Kirk **53a**)).

Eigenschaften. U. aus *Canavalia* passirt nach Jacoby **54**) nicht durch Ultrafilter, dagegen geht ein Hemmungskörper hinaus. Nach Grabar **54a**) ist der Dispersitätsgrad gering, erst eine Porenweite von 400 mμ läßt U. völlig passiren; 30 mμ hält total zurück. Die Kolloidteilchen scheinen danach dreimal so groß zu sein wie die der Blutproteine. Nach Rosenfeld **55**) ist U. wirksam sogar noch in starkem Alkohol.

Cholesterin adsorbirt; im Adsorbat aktiviren „Auxokörper" (§ 448); Alkali schwächt (Jacoby **56**)); Adsorption an Tierkohle s. l. c. 128.

Nach ihrem Verhalten gegen Antiurease sind die Enzyme aus Soja und Jackbohne identisch (Kirk **53a**)); Antiurease aus *Canavalia* fällt U. aus Soja aus und gibt mit ihr die Präcipitinreaktion (vgl. l. c. 125).

Mikrochemischer Nachweis in Geweben: Behandlung mit 80 %igem Alkohol und $Co(NO_3)_2$, Abscheidung von Co-Carbonat, Schwarzfärbung mit Na_2S Sen **56a**).

Einheit nach Sumner **70**): Enzymmenge, die 1 mg NH_3-N in 5′ bildet, aus Harnstoff bei 20° und ph = 7,0. **Kinetik.** Nach Mori **57**) beim opt. ph (7,15) und bei jedem anderen ph durchweg monomol. R. K proportional der Enzymmenge. Nach Münch **58**) ist K_s = 0,007—0,009, bleibt innerhalb einer 60fachen Enzymmenge konstant.

Anwendung der U. zur Harnstoffbestimmung. Mikro-CO_2-Bestimmung in Blut und Harn nach Ureasewirkung in seinem Apparat van Slyke **59**). Herstellung von Urease durch Permutit, Enteiweißung von Blut nach Folin, Destillation Koch **60**). Fehlerquelle bei Bestimmungen an Leber, die aus dem Arginin der Jackbohne Ū bildet Addis **61**). Bei Fluoridblut Ausschaltung des hemmenden Fluorids durch Coffein-Mg-Salicylat Rose **62**). Herstellung eines gut haltbaren Präparates, Arbeiten mit Puffer zwischen 6,6—7,8 Kay (l. c. 49), **63**).

Giftigkeit der Urease. Wie schon im H.W. S. 427 berichtet, ist U. sehr giftig, weil sie aus dem Harnstoff des Blutes und der Gewebe NH_3 freisetzt. Eine Angabe von Sunzeri **64**), daß die Giftwirkung nur bei Ligatur der Ureteren eintritt, weil sonst das Enzym oder das NH_3 zu schnell ausgeschieden wird, ist nicht bestätigt worden. Rigoni **65**) fand bei intravenöser Injektion schnellen Tod durch NH_3-Vergiftung, bei Überleben Resistenz gegen größere Dosen, Speicherung in der Leber. Bei nicht tötlichen Dosen auch Zunahme des NH_3 im Blut. Starkes Absinken des Harnstoffes in Blut und Harn; injicirter Harnstoff schützt nicht (Aggazzotti **65a**)). Intraperitoneal wirkt U. schwächer (Taketa **66**)), weil sie nach Hayashi

52) ***H. v. Euler, E. Brunius,*** Urease I. Bioch. Zs., **188**, 1 (1927). — 53) ***E. Waldschmidt-Leitz, F. Steigerwald,*** Chem. Natur der Urease. Zs. phys. Chem., **195**, 260 (1931). — 53a) ***J. St. Kirk,*** Conc. of soy-bean urease. Jl. of Biol. Chem., **100**, 667 (1933). S.A. — 54) ***M. Jacoby,*** Ultrafiltr. mit Ureaselös. Bioch. Zs., **167**, 21 (1926). S.A. — 54a) ***P. Grabar, A. Riegert,*** Ultrafiltr. de l'uréase. Soc. Biol., **117**, 712 (1934). — 55) ***L. Rosenfeld,*** Verh. der Urease g. Alkohol. Bioch. Zs., **154**, 141 (1925). — 56) ***M. Jacoby,*** Adsorpt. der Urease d. Cholest. Bioch. Zs., **190**, 157 (1927). S.A. — 56a) ***P. M. Sen,*** Meth. of locating urease within tissue etc. Ind. Jl. Med. Res., **18**, 79 (1930); BPh **58**, 164. — 57) ***Sh. Mori,*** Decomp. of urea by urease. Jl. of Biochem., 8, 1 (1927). — 58) ***H. Münch,*** Mech. der Urease-Aktiv. Zs. phys. Chem., **187**, 241 (1930). — 59) ***D. D. van Slyke,*** Gasom. determ. of urea with urease. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **22**, 486 (1925); BPh **33**, 879. — 60) ***F. C. Koch,*** A stable ... urease reagent etc. Jl. of Lab., **11**, 776 (1926); BPh **37**, 368. — 61) ***T. Addis,*** Error in the urease method etc. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **25**, 365 (1928) BPh **45**, 592. — 62) ***Ch. F. M. Rose,*** Estim. of urea by urease etc. Brit. Jl. exp. Path., **14**, 339 (1933); BPh **76**, 692. — 63) ***W. W. Kay, H. L. Sheehan,*** Determ. of blood urea by urease etc. Biochem. Jl., **28**, 1784 (1934). — 64) ***G. Sunzeri,*** Può l'ureasi agire in circolo? Boll. Soc. Ital. Biol., **2**, 796 (1927); BPh **45**, 269. — 65) ***M. Rigoni,*** Tossicità dell'ureasi etc. Arch. di Sci. Biol., **14**, 203, **15**, 29, 342 (1929/30); — 65a) ***A. Aggazzotti c. s.,*** Modif. dell N ureico etc. per injez. di ureasi. Boll. Soc. Ital. Sper., **6**, 597, 600 (1931). — 66) ***H. Taketa,*** Wirk. parenteral eingef. Urease etc. Tokoku Jl. Exp. Med., **12**, 433 (1929); BPh **51**, 329.

66a) langsam resorbirt wird, bei subkutaner Einführung kaum. Nach SUMNER sind von der krist. U. 0,3 mg für Kaninchen tötlich; nach TAUBER 67) 0,09 Einheiten je g. Körpergewicht (Maus subcutan, Kaninchen intravenös). U. wirkt agglutinirend auf rote BK (68)); jedoch handelt es sich nach SUMNER 69) bei der Hämagglutination durch Extrakte aus Canavalia um die Wirkung des Globulins Concanavalin A, nicht um die U. an sich, die reine U. agglutinirt nicht.

§ 446. Urease als Protein. Ein Problem von fundamentaler Bedeutung für die Enzymchemie haben die erfolgreichen Bemühungen SUMNER's 70—75) aufgerollt, ein hochwirksames, einheitliches und reproducirbares Präparat von U. herzustellen, dem er nun die Qualität eines „Proteins" zumisst. Das will zunächst sagen, daß es nicht nur ein unbekannter Wirkstoff auf einem Protein als Träger sein soll, sondern wirklich in rein strukturchemischer Betrachtung, als Molekül, ein Protein besonderer Art. Da diese Entdeckung etwa gleichzeitig mit den ebenso hervorragenden Arbeiten NORTHROP's weiter ausgebaut wurde, die dem gleichen Ziel zustreben, die Protein-natur in diesem Sinne für Pepsin und Trypsin zu erweisen, so werden wir die theoretischen Einzelheiten der umfangreichen daran sich anschließenden Diskussion erst beim Pepsin bringen, um so mehr, als die experimentellen Arbeiten zur Unterscheidung zwischen der sozusagen „Molekül-theorie" der amerikanischen Autoren und der „Wirkgruppe auf Träger"-Theorie vor allem der WILLSTÄTTER'schen Schule sich hauptsächlich mit dem Pepsin beschäftigt haben. Eine generelle Würdigung dieser entscheidend wichtigen Problematik muß sogar dem „Allg. Teil" vorbehalten bleiben. Denn es dreht sich hier nicht um einzelne Enzyme, sondern um die allgemeine Ausdeutung, was die Definition: „*ein Enzym ist ein Protein*" tatsächlich besagt. Denn erst dann kann man mit Sicherheit auch die experimentellen Befunde in das richtige Licht rücken und prüfen, ob es wirklich nötig ist, aus ihnen entgegengesetzte theoretische Schlüsse zu ziehen und eine Polemik fortzusetzen, die vielleicht nur wegen verschiedener Blickpunkte verschiedene Ergebnisse hervorhebt. Hier sei nur ganz kurz vorausgeschickt, daß nach dem heutigen Stand unseres Wissens diese Definition immer noch mit voller Gleichberechtigung drei Aussagen enthalten kann, zwischen denen wir experimentell noch nicht entscheiden können, und die mithin zwar eine ausgezeichnete Grundlage für eingehende experimentell gestützte Diskussionen, aber nicht eigentlich für eine theoretische Polemik geben sollten. Diese Aussagen sind:

1) Das kristallisirte Enzym ist ein System, bestehend aus einer unbekannten und analytisch unfassbaren Wirkgruppe und einem einheitlich bestimmten Protein als Träger.

2) Das kristallisirte Enzym besteht aus einem Protein als Wirkgruppe an

---

66a) ***S. Hayashi***, Parent. Resorpt. von Koll. (Urease). Bioch. Zs., **208**, 361 (1929). S.A. — 67) ***H. Tauber, I. S. Kleiner***, Toxic. of cryst. urease. Jl. of Biol. Chem., **92**, 177 (1931). S.A. — 68) ***M. Hotchkiss, H. Tauber***, Hemagglut. prop. of urease. Jl. of Immun., **21**, 287 (1931). S.A. — 69) ***J. B. Sumner, St. F. Howell***, Non-ident. of jack bean agglut. with cryst. urease. Jl. of Immun., **29**, 133 (1935). S.A. — 69a) ***Dies.***, Concanavalin A and Hemagglut. Science, **82**, 65 (1935). S.A. — 70) ***J. B. Sumner***, Cristall. Urease. Erg. Enzymf. I, 295, Leipzig 1932. — 71) ***Ders.***, Chem. Nature of enzymes. Jl. of Nutr., **6**, 103 (1933). S.A. — 72) ***Ders.***, Enzymes. Ann. Rev. of Biochem. **4**, 37 (1934). S.A. — 73) ***J. B. Sumner, V. A. Graham (Ch. V. Noback)***, Purific. of jack-bean urease. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **21**, 551 (1924); Jl. of Biol. Chem., **63**, (Proc.), XLIII (1925). — 74) ***J. B. Sumner***, Precip. of urease by lead acetate. Jl. of Biol. Chem., **67**, VIII (1926). — 75) ***J. B. Sumner***, Isol. and crist. of the enzyme urease. Jl. of Biol. Chem., **69**, 435, **70**, 97 (1926). S.A.

sich in Symplexbindung mit einer viel größeren Menge anderen Proteins als Träger.

3) Das kristallisirte Enzym ist ein einheitliches Proteinmolekül, in dem die specifische Wirkgruppe nicht symplexmäßig verankert, sondern in die Kette eingebaut ist, — wie man sich etwa auch das Insulin vorstellt. Dies also hier nur zur Problemstellung. Weiteres bei Pepsin.

SUMNER **73)** erhielt seine kristallis. U. zunächst durch Extraktion von Mehl aus Jackbohnen (*Canavalia ensiformis*) mit 30 %igem Alkohol und Ausfrieren bei — 10°; ein Präparat, das noch die Concanavaline enthielt. Diese lassen sich durch Impfung mit reinen Kristallen abscheiden. Dialyse und Behandlung mit Alkohol liefert ein Protein Urease. Über ein anderes Verfahren der Fällung mit Bleiacetat **(71)** gelangte er dann zu einem überaus einfachen Verfahren, direkt kristallis. Urease zu erhalten **(75)**. Schütteln mit 31,6 %igem Aceton, filtriren, Eisschrank. Nach 24 h spontane Kristallisation bis 60 % des gesamten Extraktgehaltes (25 % des Ausgangsmaterials). Umkristallisiren nach Waschen mit 32 %igem Aceton durch Lösen in Wasser, Zusatz von Aceton bis 32 %, Puffern auf ph = 6; Eisschrank.

Die Kristalle sind Oktaeder, sie können leicht > 4—5 μ erzeugt werden. Das Enzym ist ein Globulin, mit 16 % N, 1,2 % S, 1—2 % Asche. Isoelektrischer Punkt 5,0—5,1 **(76)**; es handelt sich um einen amphoteren Elektrolyten, da Pb auf der alkalischen Seite, Phtalat auf der sauren Seite fällend wirkt, dabei bleibt Eiweißfällung und Enzymwirkung symbat. Die Wirkungsstärke ist gleich einer Erhöhung gegenüber dem Ausgangsmaterial von der 700—1400fachen Größe. Nach mehrfachem Umkristallisiren ist der Wert 133.000 Einheiten je g.; höhere Werte scheinen nicht mehr erreichbar zu sein **(77)**. Diese U. setzt in 1 Sec. ihr gleiches Gewicht Harnstoff um. So hohe Werte sind nur aus solchen Bohnen zu erzielen, die an sich reich an U. sind. Diese enthalten bis zu 0,12 % Enzym (als Protein gemessen); Soja nur 0,01 %, andere Samen noch viel weniger .— Zusatz (oder Vorhandensein) von Schwermetallen verhindert die Abscheidung von Kristallen **(78)**. Bisweilen ist aus den *Canavalia*-Bohnen kaum kristall. U. zu erzielen; am besten ist Weiterzüchtung besonders geeigneter Bohnen **(79)**.

Eine Röntgen-aufnahme der Kristalle (FANKUCHEN **80)**) hat nicht viel ergeben; gestreckte Polypeptidketten sind unwahrscheinlich. Auch ultramikroskopische Messungen von GRABAR **80a)** sagen nicht viel: alle Präparate zeigen, daß U. an gröbere Komplexe gebunden sein muß, gut homogen ist nur die SUMNER-U., deren Teilchengröße den Globulinen entspricht.

Bei den verschiedenartigen Nachprüfungen der Annahmen SUMNER's hat es sich gezeigt, daß die Diskussionen aus den eingangs erwähnten Gründen vielfach ins Leere stießen, weil eben der Sachinhalt der Aussage: „Urease ist ein Protein" nicht klar umrissen ist. Es zeigte sich diese Unklarheit in den Auseinandersetzungen besonders in der Frage der Ausdeutung der Versuche, dieses „Protein Urease" enzymatisch zu zerlegen. Zunächst stehen nicht einmal die Tatsachen einwandfrei fest. SUMNER selbst (l. c. 70, S. 299) gibt an, daß Tryptase die Urease in ihrer Wirkung kaum schädigt, und daß bei aktivem Enzym dann auch das Protein als solches erhalten bleibt, während denaturirtes Ureaseprotein (Hitze, Stehenlassen unter Aceton) schnell abgebaut wird (Die Resistenz genuiner Proteine gegen Tryptase ist eine häufige Erscheinung). Demgegenüber fand TAUBER **81)** Inaktivirung von krist. U. durch Trypsin bei ph = 7, total in 3 Tagen, ebenso GRABAR **80a)**. Diesen diametral entgegengesetzten Ergebnissen gegenüber fand ZAKOWSKI **82)** viel verwickeltere Verhältnisse. Nur

---

76) ***J. B. Sumner, D. B. Hand,*** Isoel. point of crist. urease. Jl. Amer. Chem. Soc., **51**, 1255 (1929). — 77) ***J. B. Sumner,*** Rein. der Urease durch Kristallis. etc. Ber. Chem. Ges., **63**, 582 (1930). S.A. — 78) ***J. B. Sumner, D. B. Hand,*** Crystall. urease II. Jl. of Biol. Chem., **76**, 149 (1928). S.A. — 79) ***J. B. Sumner, R. G. Holloway,*** Crystall. urease III. ibid., **79**, 489 (1928). S.A. — 80) ***J. Fankuchen,*** X-ray patterns of crist. urease etc. Jl. Amer. Chem. Soc., **56**, 2398 (1934). S.A. — 80a) ***P. Grabar, A. Riegert,*** Nature de l'uréase. C. R., **200**, 1795 (1935); BPh **88**, 484. — 81) ***H. Tauber,*** Cristall. urease. Jl. of Biol. Chem., **87**, 625 (1930). S.A. — 82) ***J. Zakowski,*** Einwirk. von Proteasen auf Ureasepräp. Bioch. Zs., **229**, 41; Zs. phys. Chem., **202**, 249 (1930/1). S.A.

enorme Mengen von Papain (6 zu 1 Urease) ergeben eine Schädigung in 7 h um 80 %, 1 : 6 nur zu 50 %. Aktivirtes Papain wirkt stärker, am besten bei ph = 5. Er kommt zu dem Schluß, daß seine Versuche nicht eindeutig aussagen, ob das Enzym selbst oder nur der Träger angegriffen wird.

TAUBER 83) fand dann auch selbst sehr sonderbare Verhältnisse. Trypsin an sich (kristall.) greift krist. U. nicht an, wohl aber wenn man ein Schutzkolloid (Gummi arabicum) zusetzt. Er nimmt an, daß eine Gruppe der U. sich mit dem Trypsin inaktivirend bindet, die durch das Schutzkolloid unwirksam gemacht wird, so daß nun Trypsin an einer anderen Stelle spaltend angreifen kann.

Zu völlig anderen Ergebnissen gelangte WALDSCHMIDT-LEITZ 84). In Übereinstimmung mit SUMNER fand er volle Resistenz der enzymatischen Wirkung gegen Proteasen (Tryptase, Papain-HCN), aber im Gegensatz zu ihm Verlust der analytisch nachweisbaren Proteinkomponente (Fällbarkeit durch Sulfosalicylsäure). Dies letztere konnte nun wieder SUMNER 85) nicht bestätigen; weder die Fällung mit Sulfosalicylsäure, noch die mit Antiurease (s. u.) werden beeinträchtigt. Und WALDSCHMIDT-LEITZ bleibt auch in der 2. Arbeit dabei, daß das Protein abnimmt (nephelometrisch). Wie komplicirt die Dinge sind, zeigt die übereinstimmende Angabe beider Forscher, daß kleine Proteasemengen eine Aktivitätsverminderung bewirken, große nicht. Es sieht beinahe so aus, als ob gradezu ein Protein aus dem Trypsinpräparat als Stabilisator (Pheron-Ersatz) der U. auftreten kann; oder es werden nach BERSIN (l. c. 112) hemmende Proteine weggeschafft.

Auch nach den letzten Befunden von SUMNER 86) wird die Sache nicht klarer. Angesichts der Unsicherheit der Befunde mit Tryptase hat er nun mit Pepsin und mit Papain-H_2S gearbeitet, und zwar bei ph = 4,3. Dann verlaufen Eiweißabbau und Fermentschädigung symbat, was BERSIN (l. c. 112) bestätigt. Auch hier wirkt konz. Pepsin schützend. Reine Säureschädigung verläuft 20 mal langsamer. Bei 4,7 wirken sowohl Pepsin wie Papain-H_2S kaum noch. WALDSCHMIDT-LEITZ 87) bringt dies mit Recht damit in Verbindung, daß Pepsin viel schneller genuine Proteine partiell abbaut, als Trypsin; die peptischen Spaltprodukte sind also anscheinend nicht mehr als Pheron geeignet, — oder es wird die aktive Gruppe herausgeschlagen; das ist ein Streit um Dinge, die wir noch nicht wissen; der Einwand SUMNER's (l. c. 72), daß ja Pepsin weniger tief spalte, als Tryptase, greift also ins Leere. Auch GRABAR 80a) gibt an, daß kleinere Komplexe von abgebauter U. bereits unwirksam sind.

SUMNER meint, daß nach diesen Befunden WALDSCHMIDT-LEITZ seinen Einspruch zurückziehen müßte. Und damit kommen wir auf den Kernpunkt zurück: Wogegen? Die Behauptung „Urease ist ein Protein" ist eben nicht klar. Wieder kann die Pepsinverdauung ebensowohl deswegen inaktiviren, weil sie einfach aus einem Symplex Urease + Globulin das Pheron wegnimmt, wie daß sie eine eingebaute Wirkgruppe ablöst, die an sich unwirksam ist. SUMNER selbst ist darüber nicht klar, wohin eigentlich sein Anspruch steuert (l. c. 70, S. 299):

„I had never given up the idea, that the active group, or groups, in urease might not be split off intact by some means or other. It is inconceivable, that an urea molecule could combine with the whole protein molecule and there is no reason a priori why proteolytic action should destroy the active part, or parts".

Er nimmt also selbst „aktive Gruppen" im „Protein" an. Im Sinne WILLSTÄTTER-KRAUT's dürfte das nichts anderes besagen, als daß eben eine Wirkgruppe irgendwie

---

83) ***H. Tauber, I. S. Kleiner,*** Antitrypt. prop. of crist. urease. Jl. of gen. Phys., **15**, 155 (1931). S.A. — 84) ***E. Waldschmidt-Leitz, F. Steigerwald,*** Chem. Natur der Urease. Zs. phys. Chem., **195**, 260, **206**, 133 (1931/2). — 85) ***J. B. Sumner, J. St. Kirk,*** Chem. Natur der Urease. ibid., **205**, 219 (1932). S.A. — 86) ***J. B. Sumner, J. St. Kirk, St. F. Howell,*** Dig. and inact. of crist. urease by pepsin etc. Jl. of Biol. Chem., **98**, 543 (1932). S.A. — 87) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Enzymes. Ann. Rev. of Biochem., **3**, S. 47 (1934). S.A.

mit einem Protein kombinirt ist; man darf wohl annehmen, daß das Pheron hier ein bestimmtes Protein (ein Globulin) ist. Es ist grade nach dem neuesten Stande der Ansichten der WILLSTÄTTER-Schule, besonders von KRAUT, durchaus nicht unwahrscheinlich, daß dies bei vielen Enzymen der Fall ist, daß nämlich das System Enzym besteht aus einem Agon + einem speciellen Pheron, häufig proteinartiger Natur; nur ist es in anderen Fällen sehr viel schwerer oder garnicht möglich, dieses System von dem „weiteren System", d. h. den kolloiden „Begleitstoffen" zu trennen, wie es hier SUMNER resp. NORTHROP in glücklichster Weise gelungen zu sein scheint. Übrig bleibt die bisher experimentell nicht entscheidbare Frage, ob die Wirkgruppe mit diesem speciellen Pheron nur symplexmäßig gebunden oder in das Protein eingebaut ist. Zu einer principiell wichtig genommenen Diskussion scheint mir der Sachverhalt nicht geeignet zu sein; darauf werden wir wie gesagt bei den Arbeiten von NORTHROP über Proteinasen näher eingehen.

2) Einwirkung äußerer Faktoren.

a) Strahlenwirkung; Opt. ph; Elektrolyte.

§ 447 (*H.W.* § *440*). Sonnenlicht inaktivirt bei Gegenwart von Eosin (TAUBER, l. c. 81).

UV-Strahlen wirken auf hochgereinigte krist. U. nach KUBOWITZ 88) zwischen 196 und 366 mμ abschwächend, die einzelnen Wellenbereiche ganz entsprechend dem Absorptionsspektrum des Enzyms in wäss. Lös. Auch ihre Wirkung soll nach TAUBER durch Eosin verstärkt werden.

Opt. ph (*H.W.* § *441*). Nach MORI (l. c. 57) 7,15. Nach HOWELL u. SUMNER 89) liegt er aber nicht fest, sondern schwankt mit der Art des Puffers und der Konz. an U. Höchste Aktivität: 1 % U, m/8 Citratpuffer bei **ph = 6,5**. Bei Phosphat dagegen bei 7,6. Bei 2,5 % U für Citrat 6,5, Acetat 6,4, Phosphat 6,9. Auch die Grenzen liegen bei Phosphat höher (5—9), als für Citrat (4—8,5) resp. Acetat (3—7,5). Schwankungen des opt. ph bei Gegenwart org. Stoffe auch TAKEUCHI 97).

Abb. 62. ph-Akt.-Kurve der Urease in 0,10 % U nach 89).

Die U. aus Aspergillus niger hat nach BACH (l. c. 49a) ihr Opt. bei 7,5.

Elektrolyte. Die Wirkung verschiedener Salze, resp. ihrer Kationen, auf die Freilegung der U. aus den Amoebocyten des *Limulus* (LOEB, l. c. 50/1) haben wir bereits behandelt; hier sei nochmals daran erinnert, weil LOEB auch für diese Wirkungen bereits specifische Einwirkungen auf das Enzymsystem selbst heranzieht, Kombinationen des Kations mit dem Enzym im weiteren Sinne, d.h. Enzym selbst oder seinen natürlichen Aktivatoren; so verhält sich Ca ganz

Abb. 63. ph-Akt.-Kurve der Urease in 2,5 % U nach 89).

88) ***Fr. Kubowitz, E. Haas,*** Zerstör.-Spektrum der Urease. Bioch. Zs., 257, 337 (1933). — 89) ***St. F. Howell, J. B. Sumner,*** Spec. eff. of buffers upon urease activ. Jl. of Biol. Chem., 104, 619 (1934). S.A.

anders als Mg, beide anders als NaCl. LOEB fand die Anionen ohne wesentlichen Belang, während MYSTKOWSKI 90) verschiedene Wirkungen fand: Chloride, Nitrate, Jodide, Thiocyanate sollen in kleinen Dosen fördern, in starken hemmen; die lyotrope Reihe spielt keine Rolle. NaCl bei Gegenwart großer Mengen Puffer hemmt durch Bindung des Substrates, bei geringen Mengen Puffer fördert NaCl die zweite Phase (RUCHELMANN 91)), ebenso KCl; LiCl und RbCl zeigen etwas andere Wirkungen. Einfluß von Mineralwässern LOEPER c.s. 92). Günstig wirkt vor Allem Ca als Bicarbonat.

Fluor-Ion hemmt nach JACOBY 93) am stärksten beim optim. ph, starker Pufferung und Aktivirung durch KCN, und zwar durch direkte Wirkung auf das Enzym; bei mangelhafter Pufferung wird die F'-Wirkung durch NH_3 vermindert. Auch Jodide hemmen, aber besser bei alkal. Reaktion; wahrscheinlich auch hier eine Verbindung mit dem Enzymsystem; reversibel, da Jod selbst bei größten Dosen nicht total hemmt. RUCHELMANN 94) nimmt für F' in der ersten Phase Bindung an (an Enzym oder Substrat), in der II. Phase (Spaltung des Carbamates) verlangsamt es die Reaktion. Schutzwirkung des NH_3 bei mangelnder Pufferung bestätigt. — Das Anion [WO_4] hemmt stärker als Cl' (95).

Organische Stoffe. Über den anscheinend sehr unbedeutenden Einfluß der üblichen organischen Lösungs- und Fällungsmittel liegen wesentlich neue Mitteilungen nicht vor.

Über die seit langer Zeit umstrittene Förderung durch Aminosäuren gibt HUSA 96) an, daß sie tatsächlich aktiviren, aber nur dann, wenn NH_2 und COOH nicht zu weit entfernt sind; am besten wirken also α-Aminosäuren; δ nicht mehr. Chinin-HCl hemmt etwas, ebenso einige weitere komplicirte aromatische Aminosäuren. TAKEUCHI 97) konnte diese Förderung nicht allgemein bestätigen. Glycin und Alanin aktiviren; dagegen hemmen Arginin und Histidin, andere wie Asparaginsäure ohne Wirkung. Harnstoffderivate hemmen stark, ebenso Glycylasparaginsäure (durch Verschiebung des opt. ph), ferner Hydroxylamin.

Hydrochinon hemmt nach TAKEUCHI; ebenso fand QUASTEL 98) zahlreiche Polyphenole hemmend, am stärksten Pyrocatechol; Resorcinol, Phloroglucinol garnicht. KCN und Aminosäuren schützen nicht, wohl aber SH-Körper. Wahrscheinlich wirken also die Polyphenole über ihre Chinonform katalytisch oxydirend (§ 448); auch Chinon wirkt stark hemmend. Eine große Reihe von Farbstoffen hat QUASTEL 99) geprüft, basische hemmen stark, saure nicht. Amine, Cyanate, Harnstoff schützen, substituirte Harnstoffe nicht. Die Bindung zwischen U. und den basischen Farbstoffen wird durch ungesättigte Glyceride des Sojaöls stark verfestigt.

b) Aktivirung und Hemmung.

§ 448. (*H.W.* § *444*). Gegenüber diesen überall diskutirten und noch recht unsicheren unspecifischen Beeinflussungen, die wohl ganz überwiegend durch das weitere Enzymsystem bedingt und betont dispersoidchemischer Natur sind, erheben sich auch hier wieder die Fragen der mehr specifischen Beeinflussungen des engeren Fermentsystems (Agon + Pheron). Auch hier beginnen die Probleme mit noch zunächst einfach definirten chemischen Agentien, um sich schließlich in die Fragen von „Cofermenten" und „Antifermenten" zu verlieren. Wir haben ja derartige Fragen überall

---

90) ***E. M. Mystkowski,*** Einfl. der Ionen auf ... Urease. Acta Biol. exp. (poln.), 2, 211 (1928); BPh 54, 676. — 91) ***A. Ruchelmann,*** Wirk. ein. neutraler Chloride auf Urease. Bioch. Zs., **251,** 51 (1932). — 92) ***M. Loeper c. s.,*** Pouv. zymosthén. des eaux min. sur l'uréase. Bull. Soc. Chim. Biol., 8, 958 (1926). — 93) ***M. Jacoby,*** Einw. des Fluors auf die Urease. Bioch. Zs., **198,** 163 (1928), **214,** 368 (1929). S.A. — 94) ***A. Ruchelmann,*** Wirk. des NaF auf die Urease. ibid., **258,** 294 (1932). — 95) ***Ders.,*** Wirk. des Na-Wolfr. auf die Urease. ibid., **254,** 479 (1932). — 96) ***W. J. Husa,*** Eff. of amino acids etc. upon the activ. of urease. Jl. Amer. Chem. Soc., **48,** 3199 (1926). — 97) ***T. Takeuchi,*** Einfl. organ. Verbind. auf die Urease. Jl. of Biochem., **17,** 47 (1933). S.A. — 98) ***J. H. Quastel,*** Act. of polyhydr. phenols on urease. Biochem. Jl., **27,** 1116 (1933). — 99) ***J. H. Quastel,*** Act. of dyestuffs on enz. III. Urease. Biochem. Jl., **26,** 1685 (1932).

zu behandeln, aber hier bei der Urease werden sie besonders interessant. Wir haben hier ein Enzym, das erstens sehr eng specifisch und wirkungsrein darstellbar ist, zweitens auch deskriptiv-chemisch weitgehend gereinigt ist, und ferner eine sehr einfache Wirkung hat, und trotzdem zweifellos in seiner Art sowohl wie in seiner Wirkung bereits verwandtschaftliche Beziehungen aufweist zu den Proteasen, bei denen die Probleme der specifischen Aktivirung und der specifischen Hemmung durch „Antifermente" seit jeher diskutirt worden sind. In der Tat gehen die experimentellen Untersuchungen weitgehend parallel; wir werden die theoretisch-kritische Ausdeutung des experimentellen Materials auch wieder im Wesentlichen erst bei den Proteasen geben können, so bei der nicht zur Ruhe kommenden Frage der Enterokinase, der Aktivirung des Papains etc. Hier sei in der Hauptsache nur das experimentelle Ergebnis kurz wiedergegeben.

Der Angelpunkt der Probleme ist die Hemmung durch Schwermetallkationen und die Aktivirung durch gewisse organische Stoffe, die zwei Eigenschaften vereinen: nämlich erstens Komplexbildner zu sein, und zweitens reversible Redox-systeme. Und die Hauptfrage ist hier wie bei den Proteinasen kurz gesagt folgende: ist die Aktivirung der Urease durch solche Stoffe nur oder wenigstens der Hauptsache nach eine Beseitigung der Schwermetallhemmung durch Komplexbildung; oder tritt neben sie resp. an ihre Stelle die bereits bei der Arginase (§ 438) diskutirte Aktivirung direkt dadurch, daß das Agon selbst unter Komplexbildung zu einem reversiblen Redox-system wird, das nur bei einer bestimmten Potential-lage maximal aktivirt ist? Ein völlig klares Bild haben wir auch hier noch nicht, aber die Entwicklung der Dinge ist sehr interessant und gibt schon gewisse Richtungspunkte.

Der Ausgangspunkt sind Beobachtungen, besonders von JACOBY (*l. c. 110, 111*), daß Schwermetalle völlig inaktiviren, indem sie unter chemischer Bindung gradezu „künstliche Zymogene" bilden (vgl. a. *H.W.* §§ *38, 55*). Es genügen dafür schon Spuren von Metallsalzen, wie sie in nicht sorgfältig gereinigtem Wasser oder den Rohstoffen vorkommen (SUMNER). Aus dieser inaktivirenden Bindung befreiend wirken Komplexbildner wie KCN, ferner Aminosäuren (*l. c. 115—117*) **100)**, **101)**. Die Wirkung dieser noch chemisch definirbaren „**Auxo-ureasen**" verliert sich dann schließlich im Dunkel undefinirbarer Aktivirungen durch Blutserum und der überall auftauchenden Idee, daß das aktive Enzym aus Ferment + Coferment besteht, also der Annahme eines Zymogens, was immer zur Verdunkelung des wahren Sachverhaltes beiträgt (*H.W.* § *444*). Die Schädigung durch Metallspuren läßt sich paralysiren durch Zusatz von „Schutzkolloiden" verschiedenster Art (Proteine, Gummi arabicum, Mastix, Stärke, Al-hydroxyd etc. (SUMNER, l. c. 72)). Völlig geklärt sind die Dinge auch heute noch nicht.

Zunächst wurde die Rolle der Schwermetalle weiter untersucht, und zwar von SUMNER u. MYRBÄCK **102)** an hochgereinigter U. Dies ist um so wichtiger, als natürlich bei Roh-Enzymen allerlei andere Reaktionen intercurriren, so die Bindung von Schwermetall an Eiweißballast, wie sie nach KITAGAWA **103)** auch bei seinen Versuchen erkennbar ist, bei denen die Hemmung vom ph abhängig, und z.B. bei Zink nur bei alkal. R. zu finden war. S. u. M. fanden für Cu und Pb Wirkung schon in Spuren. Ag wirkt nur bei guter Pufferung, da sonst Ü das Ag vom Enzym abdrängt. 1 g Ag inaktivirt 40 Kilo Urease von 120.000 E je g; auch hier wie bei der Saccharase werden immer noch 90 % ohne Inaktivirung gebunden, nur 10 % gehen an die wirksame Gruppe selbst, und diese Bindung ist reversibel, eine wahre chemische Bindung wohl mit einer Carboxylgruppe, wie dies RUCHELMANN **104)** auch für Cu annimmt.

---

100) ***M. Jacoby***, Urease (Übersichtsref.). Fermentforsch., **10**, 1 (1928). S.A. — 101) ***M. Jacoby***, Verstärk. der Enzymwirk. durch kleinste Mengen ... bekannt. Subst. (Urease). Bioch. Zs., **181**, 194 (1927). S.A. — 102) ***J. B. Sumner, K. Myrbäck***, Schwermetallinaktiv. hochger. Urease. Zs. phys. Chem., **189**, 218 (1930). S.A. — 103) ***M. Kitagawa***, Infl. of [H+] upon the inact. of urease by ... heavy metal salts. Jl. of Biochem., **10**, 197 (1929). — 104) ***A. Ruchelmann***, Oligodyn. Wirk. einiger ... Metalle ... auf Urease. Bioch. Zs., **259**, 358 (1933).

JACOBY 105) hat seine Metallstudien wieder aufgenommen. Er fand ebenfalls für Cu, Ag, Hg feste Zahlenrelationen der Hemmung je Einheit, und dementsprechend dieselben Relationen für die Entgiftung durch KCN. Ag und Hg gleich giftig, Cu mehr. Prüft man aber die kleinste grade noch etwas hemmende Menge, so ist Hg > Cu, Ni > Ag > Fe. SCHMIDT 106) gibt die Reihenfolge (absteigend) Ag, Hg, Cu, Zn, Cd, U, Au, Pb; viel schwächer Co, Ni, Ce, Mn. Die Komplexe sind nach JACOBY fest gegen Dialyse. Die Bindung ist zuerst voll reversibel, d. h. durch KCN aufhebbar, wird aber allmählich irreversibel (nachweisbar nach 1 h, in 24 h sehr deutlich), besonders bei 37° und abhängig vom ph (Cu bei alkal., Hg bei saurer R.). Selen, das Papain nach BERSIN hemmt, und zwar vielleicht durch katalytische Oxydation, ist auf Urease unwirksam (s. aber u.) JACOBY glaubt also, bisher alle diese Hemmungen und Befreiungen auf die einfache Aufhebung der vergiftenden Komplexbindung mit dem Schwermetall erklären zu können, was MÜNCH 107) auf grund kinetischer Messungen bestätigt.

Nun hat aber JACOBY selbst schon darauf hingewiesen, daß zu den aktivirenden Stoffen auch Thiole gehören, und im Anschluß daran haben SUMNER 108) und PERLZWEIG 109) auf die Wahrscheinlichkeit hingewiesen, daß die aktivirende, d. h. befreiende Wirkung der Thiole darauf zu beruhen scheint, daß die Urease selbst ein Thiolsystem ist, also in Kombination mit der SUMNER'schen Annahme der Protein-natur ein Protein mit reichlichem Gehalt an SH-Gruppen (wie es wohl das Insulin auch ist). Der Thiolkörper ist nicht Glutathion, überhaupt nicht dialysabel, die SH-Gruppe also fest verkettet, wohl zum Hauptteil (ca 5/6) als —S—S—Gruppe wie beim Keratin (§ 478). Damit rückt die Erklärung der Phänomene dicht an die für das Papain gegebene heran, wo wir genauer darauf eingehen werden. U. gibt die Nitro-prussid-reaktion. Die SH-Gruppe bindet die Schwermetalle, Zusatz von Thiolen macht das Enzym wieder z. T. frei. Die Hemmung durch Schwermetalle aber beruht darauf, daß diese SH-Metallkomplexe im Enzym autoxydabel sind, und das Enzym im oxydirten Zustand nicht wirkt. Ebenso wie durch Schwermetalle kann man U. durch Chinon (l. c. 98), (SUMNER) oder Sauerstoff, H_2O_2 etc. (PERLZWEIG) inaktiviren. Diese Oxydation ist zunächst reversibel; solange nur 2 SH $\rightleftarrows$ S — S vor sich geht, kann sie durch Reduktion (KCN, SH) wieder rückgängig gemacht werden; überschreitet sie 50 %, so ist sie irreversibel, also eine oxydative Zerstörung (PERLZWEIG). Diese Befunde wurden im wesentlichen bestätigt von CLARK c.s. 110), die noch eine Anzahl weiterer, auch organischer Schwermetallverbindungen geprüft haben. Auch Jod hemmt, seine Wirkung kann durch H_2S, nicht HCN aufgehoben werden. Weiterhin fand BERSIN 111), daß jede Art von Hydrirung die Aktivität steigert, sowohl Glutathion wie $KHSO_3$, wie enzymatische H-Übertragung durch Succino-dehydrase. Eine natürliche Dehydrase kommt in *Canavalia* vor, die wohl zur Regulirung der Aktivität beiträgt. Jodacetat, Arsinoxyde, Arsinsäure, Selen (in Bestätigung von JACOBY 105)) hemmen U. an sich in gewöhnlichen Präparaten nicht, wohl aber in hochgereinigten; die Einstellung des richtigen Potentials wird also genau so bei unreinen Präparaten verschleiert, wie bei der Arginase. Arsenobenzole aktiviren. BERSIN zieht aus diesen Reaktionen den Schluß, daß im natürlichen Gemisch die Urease in einem Gleichgewicht 2 Ur SH $\rightleftarrows$ Ur — S — S — Ur vorhanden ist, von dem nur die hydrirte Phase wirkt. Arsinsäure bildet rein chemisch die Disulfidphase: 4 Ur SH + RAs $O_3H_2 \longrightarrow$ RAs $(SUr)_2$ + Ur SS Ur; während Arsenobenzol über das spontan zerfallende Thioarsenit die SH-Phase bildet:

$$RAs = AsR + 2\ Ur\ SS\ Ur \longrightarrow 2\ RAs\ (S\ Ur)_2 \xrightarrow{+H_2O} 2\ Ur\ SH + RAs\ O.$$

105) ***M. Jacoby***, Wirk. der Metalle auf Ferm. (Urease). Bioch. Zs., **259**, 211, **262**, 181, **267**, 167 (1933). S.A. — 106) ***E. G. Schmidt***, Inact. of urease. Jl. of Biol. Chem., **78**, 53 (1928). — 107) ***H. Münch***, Mechan. der UreaseAktiv. Zs. phys. Chem., **187**, 241 (1930). — 108) ***J.B. Sumner, L. O. Poland***, SH-compounds and crist. urease. Proc. Soc. Exp. Biol., **30**, 553 (1933). S.A. — 109) ***W. A. Perlzweig***, Activ. of urease. Science, **1932**, II, 435; Jl. of Biol. Chem., **100**, LXXVII (1933). — 110) ***L. Hellermann, M. E. Perkins, W. M. Clark***, Urease activ. as influ. by oxid. and red. Proc. Nat. Sci. U.S.A., **19**, 855 (1933). — 111) ***Th. Bersin, H. Köster***, Einw. von Aktiv. etc. auf Urease. Zs. ges. Naturw., **1935**, 230 (1935). S.A.

Sichergestellt scheint danach, daß das System Urease Sulfhydrylgruppen enthält, und daß somit die Wirkung der U. ebenfalls vom Redox-zustand abhängt, wie dies immer mehr bei verschiedenen Enzymen diskutirt wird. Zweifelhaft bleibt dabei, ob die Wirkgruppe selbst ein Thiol ist, oder ob die Thiolgruppe nur insofern mit dem Aktivitätszustand aufs engste verkuppelt ist, daß sie ihrerseits erst die eigentliche Wirkgruppe auf das richtige Potential zur maximalen Wirkung bringt. Darauf haben wir bereits bei Arginase (§ 438) hingewiesen und werden es bei den Proteinasen, speciell beim Papain, weiter zu erörtern haben; s. dazu auch BERSIN **112)**.

Im übrigen sind diese Zusammenhänge durchaus noch nicht klar. Nach Versuchen von FISCHGOLD **113)** spielt jedenfalls das Redoxpotential an sich keine entscheidende Rolle. Bei ph = 7 hemmt zwar sehr stark negatives Potential (aktivirtes H bei — 427 mV), aber nur schwach; alle anderen bis + 586 mV (Ferricyanid) sind ohne Einfluß. Die sehr starke Chinon-hemmung ist eine specifisch chemische. — Ascorbinsäure + Cu, die Arginase stark aktivirt, wirkt auf U. stark hemmend, und zwar nur das Komplexsalz an sich, nicht die einzelnen Komponenten (EDLBACHER **114)**); ebenso wirkt nach BERSIN **111)** auch Ascorbinsaure + Fe(2).

§ 449. **Auxoureasen, Zymogen.** Nach ONODERA (*l. c. 119*) soll die pflanzliche U. aus einem Enzym + Co-Enzym bestehen, was bereits im H.W. S. 790 kritisch behandelt wurde. Hierzu ist zunächst zu bemerken, daß v. EULER (l. c. 52) diesen natürlichen Aktivator überhaupt nicht auffinden konnte. Auch SUMNER **115)** bestreitet, daß es eine „Co-Urease" gibt, wie ja schon mit großer Wahrscheinlichkeit daraus folgt, daß beim mehrfachen Umkristallisiren die Wirksamkeit nicht abnimmt. Die „Aktivirung" ONODERA's war Verminderung der Hemmung durch anwesende Spuren von Schwermetallen. Reine U. + inaktivirte U. ergibt kaum eine Mehrwirkung.

MÜNCH (l. c. 107) zeigte nach kinetischen Messungen, daß es keine „Verbindung" Urease-HCN mit erhöhter Affinität gibt, daß vielmehr nur die Reakt. Geschw. durch Ausschaltung von Hemmungen erhöht wird. LOEB (l. c. 51) fand kein Co-Enzym bei *Limulus*. Damit dürfte die Zymogenfrage endgiltig bereinigt sein.

Über die Auxoureasen ist auch außer einigen Einzelbeobachtungen von JACOBY c.s. **116—118)** nur wenig nachzutragen. Im Prinzip handelt es sich wohl um nichts anderes, als mehr oder weniger vollständigen Schutz vor schädigenden Schwermetallen, die im Wasser wie im Harnstoff vorhanden sind (KITAGAWA **119)**). In dieser Art wirken beinahe alle Kolloide, auch Stärke, Gummi arabicum, Al-hydroxyd, vgl. TAUBMANN **118)**, SUMNER (l. c. 72).

Antiurease. Die alte Annahme einer immunisatorisch zu erzeugenden Antiurease ist von SUMNER **120)** neu belebt worden. In der Tat ist ja die SUMNER'sche U. als ein Protein zur Erzeugung eines Eiweiß-antikörpers sehr geeignet. SUMNER und KIRK fanden zunächst, daß man Kaninchen gegen die sehr giftige U. immunisiren kann (Schutz bis zu 1000 letalen Dosen, Anfangsdosen 20—40 γ), und daß das Immunserum sowohl die toxische wie die katalytische Wirkung aufhebt. Auch passive Immunisirung durch Injektion des Antiserums ist

---

112) ***Th. Bersin***, Thiolverbind. und Enzyme. Erg. Enzymf., IV, 68 (1935). — 113) ***H. Fischgold***, Rel. betw. activ. of urease and the ox.-red.-pot. Biochem. Jl., **28**, 406 (1934). — 114) ***S. Edlbacher, Fr. Leuthardt***, Einfl. der Ascorbins. auf Arginasewirk. Klin. Ws., **1933**, 1843. S.A. — 115) ***J. B. Sumner, J. St. Kirk***, Coenzyme for urease? Biochem. Jl., **26**, 551 (1932). S.A. — 116) ***L. Rosenfeld***, Bind. der Auxourease. Bioch. Zs., **154**, 143 (1924). — 117) ***M. Jacoby, L. Rosenfeld***, Auxokörperwirk. ibid., **158**, 334 (1925). — 118) ***G. Taubmann***, Auxowirk. eiweißfreier Koll. auf ... Soja-Urease. ibid., **157**, 98 (1925). — 119) ***M. Kitagawa***, Signif. of auxosubst. in the urease-reaction. Jl. of Biochem., **9**, 347 (1928). — 120) ***J. B. Sumner, J. St. Kirk***, Antiurease. Science, **1931**, II, 102. S.A.; Jl. of Biol. Chem., **94**, 21 (1931). S.A. **97**, LXXXVII (1932).

möglich. Auch **Hühner** bilden Antiurease (HOWELL **121**)), trotzdem U. für sie kaum giftig ist, da ihre Organe nur sehr wenig Ü enthalten, und die Vergiftung durch U. eine NH_3-Vergiftung ist. Antiurease läßt sich von den anderen Serumbestandteilen trennen (**122**), indem man das Serum mit krist. Urease schüttelt, centrifugirt und in dem Symplex durch 0,05 m HCl das Enzym zerstört. Antiurease hat den Charakter eines Globulins, verträgt 30° bei ph = 5, wird aber durch lange Dialyse zerstört. Papain zerstört bei ph = 5, Trypsin-Kinase bei ph = 7 nicht (**123**), wohl aber Pepsin (**122**).

Die Antiurease nach U. aus *Canavalia* ist mit der nach Soja-urease identisch. Die erstere fällt U. aus Soja vollständig (**123**). Die Verbindung ist eine vollkommen stöchiometrische, eine bestimmte Menge Antiurease fällt aus jeder Konz. immer die gleiche Menge U. (**122**). Sie reagirt auch noch mit U. nach Trypsinbehandlung, nicht aber nach Inaktivirung der U. mit Säuren (**124**). Auch die Immunisirungserscheinungen zeigen die Identität (**125**) (Präzipitinreaktion von Sojaurease mit Antiurease nach U. aus Jackbohnen).

3) Wirkungsweise.

§ 450 (*H.W. § 445*). **Specifität.** Wie schon im H.W. ausgeführt, ist die U. ganz oder fast ganz auf Harnstoff allein eingestellt. Auch die dort citirten Angaben, daß ganz nahe Derivate des Ü gespalten werden, werden neuerdings bestritten. Nach CAJORI **126**) ist Glucose-Harnstoff unspaltbar. LUCK (l. c. 153) fand mit seiner Magen-Urease nur noch Butyl-Harnstoff spaltbar, alle anderen Stoffe nicht; AMBROS u. MÜNCH **127**) überhaupt nur Ü selbst. Da nach ihren Befunden auch sehr nahe verwandte Stoffe (z. B. Thioharnstoff, Methylharnstoff) die Reaktionskonstante nicht ändern, also gar keine Affinität zum Enzym haben, so scheint wirklich nur der Harnstoff selbst zum Enzym eine Affinität zu haben. Es ist also nicht festzustellen, an welcher Gruppe des Harnstoffs die Ü. ansetzt. Jedenfalls führt jede Veränderung am Molekül des Harnstoffs zur Resistenz, schon die Methylirung.

Adsorption durch Tierkohle gleichermaßen von U. und Harnstoff schwächt die Wirkung nicht ab (PRZYLECKI **128**)).

Mitogenetische Strahlung. Die Reaktion zeigt eine m. Str. mit breitem Streifen bei 1950 mμ, 2 schmalere bei 2040 und 2100 und je einen vor 2200 und 2300 mμ (**129**).

Reversion der Wirkung. Die Frage, ob die U. auch synthetisch wirken kann, d. h. Harnstoff aus einer seiner Vorstufen bilden kann, sei es aus NH_3 oder aus Ammoniumcarbamat (*l. c. 135/6*), muß heute nach dem neuen Bild, das KREBS von der Harnstoffsynthese gegeben hat (§ 438, l. c. 84) mit ganz anderen Augen betrachtet werden. So einfach, wie sich PRZYLECKI **130**) die Sache vorgestellt hat, daß ein specifisches Ferment nur der Leber, eine „**Ureligase**" als reine Synthease wirkt, liegt die Sache sicherlich nicht. Daß die Leber Harnstoff nur bildet, aber nicht spaltet, ist zwar richtig, aber

---

121) ***St. F. Howell,*** Antiurease form. in the hen. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **29**, 759 (1932). S.A. — 122) ***J. St. Kirk, J. B. Sumner,*** React. betw. cryst. urease and antiur. Jl. of Immun., **26**, 495 (1934). S.A. — 123) ***J. St. Kirk,*** Conc. of soy-bean urease. Jl. of Biol. Chem., **100**, 667 (1933). — 124) ***J. B. Sumner, J. St. Kirk,*** Chem. Natur der Urease. Zs. phys. Chem., **205**, 219 (1932). — 125) ***J. St. Kirk, J. B. Sumner,*** Immunol. ident. of soy and jack bean urease. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **29**, 712 (1932). — 126) ***F. A. Cajori,*** Resist. of glucose urea to urease. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **30**, 184 (1932). — 127) ***O. Ambros, H. Münch,*** Mech. der Ureasewirkung. Zs. phys. Chem., **187**, 252 (1930). — 128) ***St. J. v. Przylecki c. s.,*** Réact. enz. dans un milieu ... hétérog. Soc. Biol., **97**, 937; The systems urea-urease-charcoal etc. Biochem. Jl., **21**, 1025 (1927). — 129) ***E. G. Prokofiewa,*** Mitog. radiat. of the urea-urease system. Nature, **1934**, II, 574. — 130) ***St. J. v. Przylecki,*** Dégrad. et synth. de l'urée. Ann. de Physiol., **3**, 519 (1927); BPh **46**, 262.

eine einfache Wirkung einer „Synthease" ist dies eben nicht. Die komplette Harnstoffsynthese von Ammoniak resp. Ammoncarbonat aus ist kein einfach reversibler Fermentprozeß, sondern eine gekoppelte Reaktion, bei der der erhebliche Energieaufwand der Synthese durch Oxydation von Zucker gedeckt werden muß (BORSOOK **131**)). Ob dabei ein Ferment mitwirkt, ist durchaus zweifelhaft; wahrscheinlich genügt das Ornithin als Katalysator vollkommen. Von dieser Totalsynthese muß also völlig abgesehen werden.

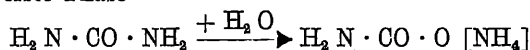
Die Angaben von WILCOX **122**) daß einfach bei ph < 5,6 U. synthetisch wirkt, sind sicher nicht richtig, ebensowenig die von SUZUKI **133**), daß Ammoncarbonat, nicht Carbamat durch U. in Harnstoff übergeführt werden kann, und die angebliche Synthese aus Ammoncarbonat durch Glycerinextrakte aus Leber, Pankreas und Muskel nach KAWAHARA **134**).

Dagegen muß durchaus neu geprüft werden, ob nicht Teilvorgänge enzymatisch reversibel sind. Wir werden unten sehen, daß sehr wahrscheinlich das Carbamat des Ammoniums das Zwischenprodukt des Abbaus ist. Und ob nicht die Reaktion Carbamat $\rightleftarrows$ Harnstoff echt reversibel ist, können wir noch nicht sagen, da dafür die energetischen Daten noch nicht bekannt sind. Auch dies betr. enzymtypische Arbeiten liegen noch nicht vor.

Der Reaktionsweg. Wie bereits im H.W. S. 792 berichtet, drehte sich die Diskussion in der Hauptsache darum, ob — entsprechend den dauernd unentschieden gebliebenen Problemen der vitalen Harnstoffsynthese — als Zwischenprodukte des ureatischen Abbaus ein Cyanat oder das Ammoncarbamat zu betrachten ist.

Die erstere von FEARON (*l. c. 131*) **135**) begründete Annahme ist fast allgemein abgelehnt worden (**136—138**).

Tatsächlich haben SUMNER c.s. **140**) mit großer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen, daß Ammoncarbamat nach YAMASAKI (*l. c. 132*) das Zwischenprodukt der Spaltung ist. Durch Neßlerisation vor und nach Ansäuerung (wobei es zerfällt) läßt sich das Carbamat analytisch bestimmen, indem diese vorher nur 50 %, nach dem Ansäuern das gesamte NH_3 anzeigt. So ließ sich das Carbamat direkt als Zwischenprodukt in der Kälte bei kurzen Versuchen nachweisen. (Abb. 64). Cyanat entsteht dabei nicht. Dieser Reaktionsweg scheint in den neueren Arbeiten allgemein angenommen zu sein; z.B. hat ihn RUCHELMANN (l. c. 94) seinen Untersuchungen über chemische Beeinflussungen zu grunde gelegt. Man wird wohl damit rechnen dürfen, daß nur diese erste Phase

$$H_2N \cdot CO \cdot NH_2 \xrightarrow{+H_2O} H_2N \cdot CO \cdot O\,[NH_4]$$

enzymatisch katalysirt werden muß, die Weiterumwandlung in das Carbonat $CO\,(O\,[NH_4])_2$ spontan verläuft. Jedenfalls verschwindet das Carbamat auch allmählich nach Ausschaltung des Enzyms (**140**) unter Bildung von Carbonat. (Abb. 65). Es hängt dies wohl auch mit den noch nicht sicher geklärten Strukturfragen des Harnstoffs im freien Zustande (vgl. l. c. 127)

---

131) ***H. Borsook, G. Keighley,*** Energy of urea synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci., **19**, 626, 720, **20**, 179 (1933/4). S.A. — 132) ***J. M. Wilcox,*** Rel. betw. the isoel. range of urease and the revers. of its action. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **27**, 228 (1929). — 133) ***B. Suzuki, T. Maruyama,*** Synth. of urea by urease. Proc. Imp. Ac. Tokyo, **6**, 63 (1930). — 134) ***S. Kawahara,*** Harnstoffbild. aus kohlens. Ammon. in ... vitro. Jap. Jl. of Med. Sci., **1**, 233 (1927); BPh **46**, 219. — 135) ***W. R. Fearon,*** Sign. of cyanic acid in the urea-urease-system. Jl. of Biol. Chem., **70**, 785 (1926). — 136) ***J. B. Sumner,*** Is cyanic acid an interm. prod. of the act. of urease? Jl. of Biol. Chem., **68**, 101 (1926). S.A. — 137) ***C. Artom,*** Prod. di NH_3 per idrol. dei cianati. Boll. Soc. Ital. Biol., **1**, 414 (1926); BPh **40**, 840. — 138) ***A. Bornstein, R. Pantke,*** Cyansäure als Zwischenprod. des Aminosäurestoffw. Bioch. Zs., **225**, 330 (1930). — 140) ***J. B. Sumner, D. B. Hand*** (***R. G. Holloway***), Ammon. carbamate as the intermed. prod. in the act. of urease. Proc. Soc. Exp. Biol., **27**, 292 (1930); Jl. of Biol. Chem., **91**, 333 (1931). S.A.

zusammen, da ja Urease bei neutraler Reaktion wirkt. Da aber enzymtypische Untersuchungen dazu nicht vorliegen, sei darauf nicht weiter eingegangen. Es sei nur kurz bemerkt, daß WAGENAAR **141)** mit einem Extrakt aus den Samen von *Ceratonia siliqua* eine Spaltung nur bis zum Carbamat beobachtet haben will.

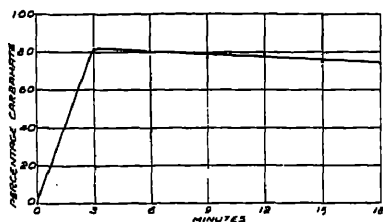



Abb. 64. Formation of ammonium carbamate by urease (nach **140**)).

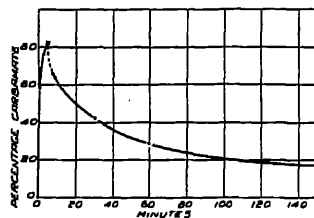



Abb. 65. Formation of carbamate and destruction after poisoning urease (nach **140**))

4) Vorkommen.

§ 451. Phanerogamen. Gegenüber der älteren Periode, die sich vorwiegend mit der U. der harnvergärenden Bakterien befasst hat, ist heute die U. der Samen, speciell der Leguminosen, ganz in den Vordergrund getreten. Im übrigen ist nach den systematischen mikrochemischen Untersuchungen von WASICKY **142)** anzunehmen, daß U. überall zu finden ist.

Die reichste Quelle ist die Jackbohne (Schwertbohne) *Canavalia ensiformis*; daneben die Sojabohne *Soja* (*Glycine*) *hispida*. Diese beiden dienen nunmehr fast ausschließlich zur Darstellung des Ferments. Eine gute und billige Quelle sind nach MENON **143)** die Samen von *Dolichos biflorus*, reicher als Soja; weniger gut *Cajanus indicus*.

Bei *Canavalia* und *Soja* sind die Ausbeuten je nach den Varietäten sehr schwankend, u. U. kann Soja ebensoviel U. enthalten, wie dies bei australischen Bohnen HINDMARSH **144)** fand. — Nach WAGENAAR **145)** enthält auch Samen von *Abrus* U.; im übrigen fand er in der Gruppe der Leguminosen nur bei den *Papilionaceae* „echte" U., sonst nur Bildung von Carbamat (**141**), so bei *Ceratonia*. — In Cucurbitaceen fand IMAI **146)** U., und zwar reichlich in der Wassermelone *Citrullus*, weniger in *Cucurbita*, in anderen sehr wenig.

In der Rinde von *Robinia pseudacacia* fand eine an Globulin gebundene U. JONES **147)**.

Schimmelpilze. Nach BACH **148)** ist die U. von *Aspergillus niger* ein Endoenzym, das niemals in die Kulturen übergeht. Harnstoff und Pepton im Nährboden erhöhen den Gehalt. Dieser nimmt beim Wachstum schnell zu, beim Beginn des Zerfalls schnell ab. Auch in extrahirten Präparaten ist die U. noch an geformte Teilchen gebunden. Auch MIWA **149)** fand Bildung von U. bei Anwesenheit von Eiweißabbauprodukten, Förderung durch Glucose oder Fett. Junge Kulturen am reichsten, Extraktion nicht möglich. Bei Mangel an KH, aber reicher

---

141) ***M. Wagenaar***, Z. Kenntn. des Johannisbrots (Urease). Pharm. Weekbl., **62**, 397 (1925); BPh **32**, 71. — 142) ***R. Wasicky, S. Krach***, Verbreit. der Urease im Pflanzenreich. Öst. bot. Zs., **77**, 271 (1928); BPh **38**, 470. — 143) ***V. K. N. Menon, D. N. Rao***, A new and cheap source of urease. Ind. Jl. Med. Res., **19**, 1077 (1932); BPh **68**, 552. — 144) ***E. M. Hindmarsh***, Var. in the urease content of . . . soya bean. Austral. Jl. Exp. Biol., **3**, 167 (1926); BPh **38**, 809. — 145) ***M. Wagenaar***, Z. K. des Samens von Abrus. Pharm. Weekbl., **61**, 805 (1924); BPh **29**, 568. — 146) ***S. Imai***, Vork. von Urease in den Samen der Cucurbit. Jl. of Orient. Med., **3**, 53 (1925); Ber. Phys., **33**, 681. — 147) ***D. B. Jones, C. E. F. Gersdorff, O. Moeller***, Proteins of the bark of . . . robinia (Urease). Jl. of Biol. Chem., **64**, 655 (1925). — 148) ***D. Bach***, Evol. de l'uréase dans les cult. de l'Asp. niger. Bull. Soc. Chim. Biol., **11**, 1007, 1016 (1929). — 149) ***T. Miwa, S. Yoshii***, Bildung der Urease bei Asp. niger. Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daig. B, **1**, 243 (1934); BPh **84**, 313.

Stickstoffnahrung, verschwindet die U.; dann wird Harnstoff ausgeschieden (IWANOFF **150**)).
U. in **Meeresbakterien** Zo BELL **151**), bis zu 1800 m. Tiefe (Schlammproben).

Bedeutung der pflanzlichen Urease. Abgeschen von den Harn vergärenden Bakterien und anderen Saprophyten, die wenigstens gelegentlich mit Harnstoff in Berührung kommen können, war die physiologische Funktion der U. nicht recht klar. Daß Harnstoff auch in Pflanzen vorkommt, ist längst bekannt (z. B. FOSSE, *l. c. 27*); es blieb aber die Frage offen, ob auch die Pflanze einen sozusagen „echten" Harnstoff-Stoffwechsel hat, d. h. ihn auch synthetisch wie das Wirbeltier aufbauen kann. Es scheint dies aber nach den Arbeiten von IWANOFF (§ 439, l. c. 151/2) auf die höheren Pilze beschränkt zu sein, die eine wahre, der der Leber vergleichbare synthetische Harnstoffbildung besitzen. Bei allen anderen, und besonders den Phanerogamen, scheint nach KLEIN **152**) die Harnstoffbildung beschränkt zu sein auf die dem Arginin-Vorrat entsprechende Menge (§ 439); und dieser Ü wird weiter zerlegt. Daß grade die eiweißreichen Samen am meisten U. enthalten, ist dann kein Wunder, denn die pflanzlichen Globuline der Samen sind sehr reich an Arginin und liefern somit reichlich Harnstoff (KIESEL, § 439, l. c. 150). U. ist somit für die Pflanzen ein notwendiges Stoffwechselenzym des Eiweiß-endabbaus, um den an sich unverwertbaren Harnstoff aus dem Arginin wieder in assimilationsfähiges NH_3 umzuwandeln. Ob es außer dem Arginin noch andere Quellen für die endogene Harnstoffbildung in den pflanzlichen Proteinen gibt, ist damit nicht unbedingt auszuschließen; es spielen hier eventuell die noch immer unsicheren ähnlichen Gruppirungen im Proteinmolekül vom Typus der Uraminosäuren eine unklare Rolle.

§ 452. Urease bei Tieren. Die offene Frage, ob U. bei Wirbeltieren vorkommt, ist in ein neues Stadium getreten durch die mehrfach betonte Angabe von LUCK **153, 153a**), daß sie in der **Magenschleimhaut** aufzufinden ist.

Die Spaltung von Harnstoff ist am stärksten bei Carnivoren, findet sich auch bei Rind und Schaf, fehlt bei Ziegen und Nagern. Beim Wiederkäuer fehlt sie im Abomasus. Das Enzym ist von Sojaurease nicht zu unterscheiden (ph, specifische Wirkung etc.). Per os oder intravenös eingeführter Ü wird in der Magenschleimhaut zerlegt, so daß das NH_3 in der Magenvene zunimmt. Eine synthetische Funktion bei der Bildung von Ü hat das Enzym nicht. Es scheint also eine im Einzelnen nicht bekannte Funktion grade im Magen zu haben. RIGONI **155**) denkt im Sinne der Theorie von MATHEWS über die Sekretion der Salzsäure daran, daß die Drüsenzellen $[NH_4]Cl$ ausscheiden, das hydrolytisch zerfällt. Im Muskel fehlt es. Bestätigung durch MAJOROW **154**); U. fehlt im Pylorus, sowie bei Schwein, Kaninchen, Schaf. RIGONI **155**) hat die U. auch im menschlichen Magen (Operationsmaterial) gefunden, ebenso beim Hund, in unregelmäßiger Verteilung über die verschiedenen Abschnitte. Im Magensaft keine U. Dagegen behauptet MARTIN **156) 157**) die Anwesenheit von U. auch im normalen Saft; sie ist nur wenig wirksam und hat eine andere ph-Kurve als die SUMNER'-

---

150) ***N. N. Iwanoff***, Ausscheid. des Harnstoffs bei Pilze.n Bioch. Zs., **157**, 229 (1925). — 151) ***Cl. E. Zo Bell, C. B. Feltham***, Urea splitt. bact. in the Sea. Science, **1935**, I, 234. — 152) ***G. Klein, K. Tauböck***, Phys. des Harnstoffs in der höh. Pflanze. Oest. botan. Zs., **76**, 194 (1927); BPh **44**, 758. — 153) ***J. M. Luck***, Demonstr. of urease in the animal body. Biochem. Jl., **18**, 825 (1924). — 153a) ***J. M. Luck, T. N. Seth***, Gastric urease. ibid., **18**, 1227, **19**, 357 (1924/5). — 154) ***S. Majorow***, Urease im Organismus der Tiere. Bioch. Zs., **241**, 228 (1931). — 155) ***M. Rigoni***, Ureasi n. mucosa gastr. etc. Arch. di Sci. Biol., **15**, 37 (1930); Atti Soc. Med.-Chir., Padova, **8**, 11 (1931); BPh **66**, 641. — 156) ***L. Martin***, Urea splitting enz. found in the gastric juice. Bull. Hopkins Hosp., **52**, 166 (1933). — 157) ***Ders.***, Urea splitt. enz. and pepsin etc. Jl. of Biol. Chem., **102**, 131 (1933).

Abgeschlossen: 30. 3. 36. Ber. Phys. **91**, H. 3/4.

sche U.; sie ist an ein Globulin gebunden (Gastroglobulin), das einen isoel. P. = 3,5 hat, zusammen mit Pepsin. — CARDIN 158) fand die U. der Magenschleimhaut auch bei tierischen und menschlichen Feten.

Andere Organe. MAJOROW 154) fand U. reichlich in der Hypophyse, ferner — außer Magen, s. o. — noch in Ovar und Nebenniere. — In der Placenta kommt U. nach ABE (l. c. 31a) nur selten vor (2 mal bei 17). Es sei dazu bemerkt, daß nach BOTELLA-LLUSIÀ 159) die Placenta reich an Harnstoff ist und vielleicht einen echten Harnstoff-Stoffwechsel wie die Leber zeigt. — In der Niere fehlt U. überall, auch beim Frosch (PRZYLECKI 160)). In den Organen der Wirbeltiere findet wahrscheinlich überhaupt keine NH_3-Bildung aus Ū statt.

Im Speichel fand hin und wieder U. VLADESCO 161); Bedingungen ihres Auftretens nicht zu ermitteln (vermutlich Bakterien). Im Harn von Kaninchen, besonders bei Nephritis TAKETA 162).

Wirbellose. Hier ist U. wohl ziemlich allgemein verbreitet. Über ihre Funktion ist bei den noch recht ungeklärten Fragen des Eiweiß-stoffwechsels Endgiltiges noch nicht auszusagen. PRZYLECKI 163) fand U. reichlich bei Mollusken (*Mytilus*, *Helix*), wenig bei *Lumbricus* und *Astacus*, sie fehlt bei *Hirudo*, trotzdem dieser sehr große Mengen NH_3 ausscheidet. Hauptsitz die Leber.

LOEB 164) fand reichlich U. bei *Limulus polyphemus*, und zwar im Muskel, im Blut und den Eiern. Die Hauptquelle sind die Amöbocyten, deren U. LOEB dann (l. c. 50/1) in bezug auf ihre Extraktion und ihr Verhalten gegen Salze näher untersucht hat. Bei *Homarus* und allen anderen Crustaceen fehlt U. im Blut. In der Leibeshöhle von Polychäten (*Vermes*) (*Arenicola marina*) fand U. STRUNK 165).

---

158) ***A. Cardin,*** L'ureasi n. mucosa gastr. del feto. Arch. di Sci. Biol., **19,** 76 (1933). — 159) ***J. Botella-Llusià,*** Harnstoffbild. der menschl. Placenta. Arch. für Gynäkol., **159,** 27 (1935); BPh **90,** 563. — 160) ***St. J. v. Przylecki,*** Orig. de l'ammon. excr. par les reins. Arch. intern. Phys., **24,** 13 (1924), **25,** 45 (1925). S.A. — 161) ***R. Vladesco,*** Hydrol. de l'urée sous l'infl. de la salive de l'homme. Soc. Biol., **109,** 1001 (1932). — 162) ***H. Taketa,*** Ureolyt. act. in the urine etc. Tohoku Jl. Exp. Med., **12,** 153 (1929); BPh **51,** 765. — 163) ***St. J. v. Przylecki,*** Uréase chez les invert. Arch. internat. Phys., **20,** 103 (1922). S.A. — 164) ***L. Loeb, O. Bodansky,*** Occurr. of urease in . . . Limulus. Jl. of Biol. Chem., **67,** 79 (1926). — 165) ***C. Strunk,*** Urease in . . . Arenicola marina. Zool. Anz., **109,** 297 (1935); BPh **88,** 199.

XII. Hauptteil.

Proteasen I.

A. Bau und Abbau der Proteine.

I. Allgemeines.

1) Einführung.

§ 454. Die Hauptgruppe der Proteasen ist der Inbegriff aller Enzyme, welche das große Aggregat der Proteine hydrolytisch abbauend verkleinern, bis es schließlich über die letzte Vorstufe, die Dipeptide, zu den einfachsten Bausteinen, den Aminosäuren, aufgeteilt ist. Rein schematisirend gehören die Proteasen als Enzymgruppe zu den Amidasen, denn sie alle greifen die Säureamid-bindung —C(=O)NH— in den Peptiden an. Wir haben diese schematische Zusammengehörigkeit § 431 bei der Systematisirung der Amidasen hervorgehoben und dort bereits betont, daß eine Einordnung des gewaltigen Gebietes der Proteasen in dieses Schema durchaus unzweckmäßig wäre. Wir können uns also mit diesem theoretischen Vorbehalt begnügen und die Proteasen als eigene Gruppe schildern. Im übrigen sei nur nochmals kurz erwähnt, daß Übergänge vorhanden sind. Die Spaltung einiger an der Aminogruppe acylirter Aminosäuren resp. Peptide wird durch Enzyme bewirkt, die entweder ganz specifisch sind und dann zwischen den Gruppen stehen, oder aber als nur relativ specifisch willkürlich der einen oder anderen Gruppe zugeordnet werden können (§ 444).

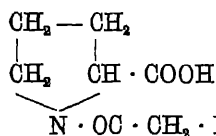
Seit dem Erscheinen des H.W. ist auf diesem Gebiete eine grundlegende Umwandlung vor sich gegangen, die eine völlige und glücklicherweise durchaus klare Neuordnung des Gebietes erzwingt und ermöglicht (vgl. Grassmann 1, 2)). Wir wissen heute mit Sicherheit, daß alle Proteasen dieselbe chemische Wirkung am Substrat ausüben, nämlich die oben angedeutete Amidasenwirkung, die Lösung der in den Peptiden vorhandenen -CO-NH-Gruppe unter Bildung freier Aminogruppen und freier Carboxyle.

Dieses Grundprincip jeglicher Proteasen-wirkung, daß freies Carboxyl und freie Aminogruppen auftreten, hat eine interessante Ausnahme. Unter den Bausteinen der Proteine findet sich auch einer, der eigentlich keine Aminosäure ist, sondern ein Kern-N besitzt, das **Prolin** (für das Oxyprolin gilt natürlich dasselbe). Wenn nun Prolin peptidisch derart gebunden ist, daß das Carboxyl einer anderen Aminosäure an das NH des Ringes gekoppelt ist, wie im Glycylprolin, so entsteht bei der Hydrolyse nicht eine Aminogruppe, sondern es wird die

---

1) ***W. Graßmann***, Proteasen. Hb. der Biochem., 2. Aufl., Erg. Band Jena 1930, S. 175. — 2) ***W. Graßmann***, Proteasen. Hb. der Biochem., Erg. Werk, Bd. I, Jena 1933, S. 472.

Iminogruppe des Kerns wieder frei. Auch solche Bindungen sind dem enzymatischen Angriff zugänglich, wie BERGMANN 3) an synthetischen Substraten sowohl wie an Glutin (mit 20 % Prolin) zeigte; es sind hier zwar Special-fermente nötig (§ 459), aber sie gehören auch zu der großen Gruppe der Proteasen; die Aequivalenz von NH: COOH bleibt auch hier gewahrt.

```
CH2 — CH2
|     |
CH2   CH · COOH
  \  /
   N · OC · CH2 · NH2
```

Zur Erreichung des Zieles dieser vollkommenen Klärung der Grundprobleme haben sich in ähnlicher Weise wie bei den Polyasen die moderne Strukturforschung der Substrate und enzymtypische Untersuchungen die Hände gereicht. Die Versuche mit enzymatischem Angriff haben auch bei genuinen Proteinen gezeigt, daß jeder Abbau sofort den Nachweis vermehrter freier NH_2-Gruppen und COOH-Gruppen ermöglicht, und zwar stets, wie es die Theorie verlangt, im Verhältnis 1 : 1. Dies gelingt auch mit dem Enzym, das man als typisch „eiweißangreifend" von jeher gesondert betrachtet hat, dem Pepsin, das ja niedere Abbaustufen der Proteine überhaupt nicht mehr angreift, ebenso aber mit der nunmehr annähernd rein darstellbaren Tryptase (Näh. u. Lit. § 478a). Die Enzymforschung hatte es also hier an der Hand dieser bequemen und sicheren Methodik leichter als bei den Polyasen, den Nachweis zu führen, daß jeder enzymatische Angriff auch an den Proteinen selbst eine **hydrolytische Spaltung**, eine Verkürzung der Ketten ist, während es dort erst das Zusammenfassen aller Kenntnisse ermöglichte, diesen grundlegenden Fortschritt zu sichern. Während es also bei den Polyasen erst die Umwälzung in den Begriffen betr. die Struktur der Substrate war, führte bei den Proteasen die rein enzymtypische Untersuchung primär zu dem Ergebnis, daß es nicht — wie wir im H.W. diskutirt haben — zwei Arten von Proteasen gibt, nämlich eine rein „desaggregirende" Gruppe, die nur die großen Associate in ihre vorgebildeten Grundkörper zerlegt; und eine zweite, die dann die kleineren Grundkörper hydrolytisch in Aminosäuren zerlegt. Daß diese Annahme überflüssig ist, habe ich bereits im „Lehrbuch der Enzyme" (1927), S. 358, klar zum Ausdruck gebracht, vgl. a. 4). Es gibt nur eine Gruppe von Proteasen, die sämtlich Hydrolasen sind, und nur eine verschiedene Specifität zeigen, die — wie bei den Polyasen — in der Hauptsache auf die Kettenlänge gerichtet ist. So gibt es Enzyme für die sehr langen Ketten der Proteine selbst, für die mittellangen Ketten höherer Polypeptide, und für die Dipeptide. Dadurch ist es möglich, ein straff geschlossenes System der Proteasen aufzubauen, das wir § 458 im Einzelnen geben werden. Ob die Specifität nur auf die Länge der Ketten eingestellt ist, oder ob es noch besondere Gruppirungen struktureller Art sind, welche die so gebildeten Hauptgruppen von einander trennen, werden wir noch eingehend zu diskutiren haben; hier sei nur vorausgeschickt, daß innerhalb der Hauptgruppen die Untergruppen zum mindesten bei den Polypeptidasen deutliche Specifitäten auf bestimmte Strukturen erkennen lassen. Ebenso müssen die drei großen Gruppen der die genuinen Proteine angreifenden Enzyme, die Pepsinasen, Tryptasen und Papainasen, verschiedene Angriffspunkte haben, da sie alle drei im Großen betrachtet dieselben Proteine angreifen und dieselben Abbauprodukte erzeugen, trotzdem ihre Wirkungsbedingungen völlig verschieden sind. Ob hier nur die bekannten physiko-chemischen Verhältnisse, besonders also die Ionisirung, für das Ansetzen der drei Fermente entscheidend sind,

---

3) ***M. Bergmann c. s.***, Proteol. Ferm. Zs. phys. Chem., **212**, 72 (1932); Ber. Chem. Ges., **65**, 1747 (1932). — 4) ***C. Oppenheimer***, Üb. die Frage der Existenz rein desaggr. Enzyme. Bioch. Zs., **179**, 261 (1926).

oder ob in den Proteinen doch noch bestimmte Strukturen vorhanden sind und durch die verschiedenen Hauptgruppen bevorzugt angegriffen werden, das wissen wir noch nicht, das hängt mit den noch völlig ungelösten Rätseln des Baus der Proteine zusammen, den wir nun betrachten müssen.

2) Der Aufbau der Proteine *).

§ 455. Die Lehre vom Aufbau der Proteine (5, 6) ist im Großen genau denselben Umweg gegangen, wie die vom Aufbau der Polyosen. Auf die ältere Lehre der klassischen Strukturchemie EMIL FISCHER's ist eine kurze Blüte der Lehre von den „kleinen Grundkörpern", die durch rein associative Kräfte zum Aggregat verbunden sind, auch hier aufgetreten; und hier wie dort ist diese Lehre bald wieder zusammengebrochen auf Grund der neuen Erkenntnisse und Begriffsbildungen; auch bei den Proteinen hat die Theorie der langen Ketten an sich gesiegt, wenn auch hier zweifellos die Verhältnisse im einzelnen ganz anders liegen als bei den Polyosen, und anders liegen müssen, da hier die Kräfte, die zwischen den Ketten obwalten, wegen der ionalen Eigenschaften der in den Ketten gebundenen Einzelglieder ganz andere sein müssen, als die reinen VAN DER WAALS'schen Kräfte zwischen den elektrisch neutralen Glykosidketten der Polyosen. Da jede Lehre vom Eiweißaufbau ausgehen muß von der sicheren Tatsache, daß die Baugruppen Polypeptide sind, so baute sich die Lehre von den kleinen Grundkörpern naturgemäß darauf auf, daß diese Strukturelemente anhydrische Abkömmlinge der Polypeptide sein müßten.

Die Lehre von den kleinen Grundkörpern habe ich im „Lehrbuch der Enzyme" (1927) kurz dargestellt; sie entspricht im Prinzip genau der bei den Polyosen. Man ging aus von dargestellten einfachen anhydrischen Substanzen, die man aus Proteinen erhalten kann, entsprechend den Hexosanen, nämlich den Anhydriden von Dipeptiden, den Dioxopiperazinen. Aber ebensowenig wie die darstellbaren Dihexosane konnten die darstellbaren Dioxo-piperazine die „echten" Grundkörper sein: sie associiren nicht und sind unspaltbar durch Enzyme (s. z. B. WALDSCHMIDT-LEITZ 6), 7)). Die bekannten Diketo-piperazine können ferner deswegen keine Grundkörper sein, weil die Dipeptidasen auf eine freie Aminogruppe, die Carboxy-polypeptidasen auf eine freie Carboxylgruppe angewiesen sind, die beide diesen Ringkörpern fehlen.

Die wahren Grundkörper müßten also andere Stoffe gleicher Zusammensetzung sein, welche die gesuchten Fähigkeiten haben. Die Frage, ob man enzymempfindliche Grundkörper herauspräpariren kann, hat dann in den folgenden Erörterungen kaum eine Rolle gespielt; kurz gesagt, man fand keine von den einfachen Diketopiperazinen einerseits, den echten Polypeptiden andererseits verschiedene Substanzen, die spaltbar sind, wenn man nicht die angeblich durch Enzyme im Piperazinring spaltbaren Verbindungen von Anhydriden + Peptiden dazu rechnen will, die uns § 473 begegnen werden. Um so wichtiger war die Suche nach solchen Bausteinen, welche die Fähigkeit zu erneuten Bindungen haben, also zur Errichtung höherer Strukturen tauglich erscheinen könnten. Hier liegen nun von vornherein zwei theoretische Möglichkeiten vor.

§ 456. Besondere Strukturgruppen oder reine Associate? Entweder es gibt Baugruppen, die unter sich noch strukturchemisch gebunden sind. Für solche Bindungen bieten sich als verlockende Modelle die freien Hydroxyle der Oxy-aminosäuren dar (Serin, Oxyprolin u.a.) an denen sich echte Aetherbindungen ausbilden könnten, die zu

*) Hier wird nur ein Überblick gegeben; Einzelheiten und weitere Lit. s. §§ 469 ff.

5) ***H. Handovsky***, Allgem. Chemie der Proteine. Hb. der Biochem., Erg. Werk, Bd. I, S. 320, Jena 1933. — 6) ***E. Waldschmidt-Leitz***, Strukturfragen der Proteinchemie. Naturwiss., **1926**, 129. — 7) ***E. Waldschmidt-Leitz c. s.***, Spec. von Pankreastrypsin u. Darmerepsin. Ber. Chem. Ges., **61**, 299 (1928).

höheren Gebilden führen, eine Möglichkeit, an die schon EMIL FISCHER gedacht hat. Ein Nachweis ist niemals geglückt; ebensowenig der von mit solchen Aetherbindungen in Zusammenhang gebrachten tautomeren Formen von Peptid-anhydriden, von Enolformen der Diketopiperazine, denen KARRER (*l. c. 4*) die Fähigkeit zumessen wollte, die Grundkörper zu verbinden. Auf die Theorien anderer Ringbildungen haben wir schon im H.W. § 474 einen Blick geworfen; es ist bisher nichts irgendwie Wesentliches dabei herausgekommen.

Eine andere Möglichkeit ist das Vorhandensein von ganz anderen verbindenden Gruppen, wobei in erster Linie an Harnstoffgruppen gedacht worden ist in der Art, daß eben ein neues Carbonyl an zwei Aminogruppen ansetzend die Grundkörper verbindet, $CO<\begin{matrix}N-H.R\\N-H.R\end{matrix}$. Die Vorstellung solcher **Uraminosäuren** im Proteinmolekül ist alt und z.B. von BRIGL 8) neu belebt worden, auf Grund seines Befundes, daß die Proteine nicht, wie es die reine Polypeptidstruktur verlangt, Sauerstoff und Monoamino-N in aequivalenter Menge enthalten, sondern mehr O. GOLDSCHMIDT 9) hat diese Deutung in Zweifel gezogen, wir kommen auf Einzelheiten § 476a zurück. Bei diesen gesamten Forschungen bzgl. Sonderstrukturen in den Proteinen ist generell Wichtiges nicht herausgekommen, denn dazu kann man die an sich interessante Feststellung nicht rechnen, daß die Keratine ihre übergroße chemische Beständigkeit der Tatsache verdanken, daß ihre Thiolgruppen in der Disulfidform miteinander in der Quere verhaftet sind, und dieses besonders geartete Aggregat bei der alkalischen Hydrirung (durch Thioglykolsäure u. dergl.) auseinanderfällt (GODDARD und MICHAELIS 10)), wobei das Zerfallsprodukt immer noch ein Protein ist. Die Autoren nehmen an, daß die — auch nach dem RÖNTGEN-Diagramm von Wolle wahrscheinliche — Querbindung doppelter Natur ist: erstens eine salzartige zwischen $[NH_3]^+$ und $[COO]^-$ und zweitens die S—S-Bindung. Alkalische Reaktion muß erst die erste lösen, ehe die Hydrirung erfolgen kann. Selbst wenn man noch weitere derartige Sonderstrukturen und Zwischenbindungen auffinden sollte, werden sie an sich wichtig sein, um die so stark abweichenden Eigenschaften einzelner Eiweißkörper zu deuten; für das Hauptproblem des Baues der Proteine überhaupt haben sie nie eine tatsächliche Bedeutung besessen (Weiteres § 477).

So blieb denn nur die andere Möglichkeit: man konnte Grundkörper annehmen, die in sich die Fähigkeit trugen, zu associiren, d. h. nicht durch strukturelle Hauptvalenzen, sondern durch Molekularvalenzen (Nebenvalenzen, VAN DER WAALS'sche Kräfte) zu höheren Gebilden zusammenzutreten. Man suchte also in voller Analogie zu den Hexosanen Gebilde, die sich ebenso leicht associiren wie dispergiren lassen. Dies nachzuweisen, hat BERGMANN 11), 12) versucht. Er stellte z.B. aus Glycyl-serin durch Wasserabspaltung ein Methylendiketopiperazin her, das an sich ein einfacher molekular-disperser Stoff ist, mit Alkali aber in eine unlösliche hochmolekulare Form übergeht, die aber trotzdem in Phenol zu geringer Molgröße dispergirt wird und bei der Acetylirung und Hydrirung wieder in einfache Anhydridderivate übergeht, bei der hydrolytischen Spaltung freilich ein Tetrapeptid bildet. Ähnliches hat ABDERHALDEN 13) am Glycyl-glycin beobachtet, das beim Erhitzen in eine hochmolekulare unlösliche Form übergehen sollte. Die nicht wegzuleugnende Tatsache, daß bei der Proteinspaltung Polypeptid-Ketten von 8 und mehr Gliedern nachweisbar sind, wurde damit gedeutet, daß innerhalb dieser höheren Komplexe eine Ausgleichung der Valenzen stattfindet, so daß bei ihrer Spaltung eben auch größere Bruchstücke herausgeschlagen werden können.

Die Tragweite solcher Befunde ist zuerst, aber nur kurze Zeit, überschätzt worden; mit dem Sturz der kleinen Grundkörper bei den Polyosen fiel automatisch auch die ja niemals

8) ***P. Brigl, R. Held,*** Eiweißchemie III. Zs. phys. Chem., **152,** 230 (1926). — 9) ***St. Goldschmidt,*** Konst. der Proteine. Zs. phys. Chem., **165,** 149, **170,** 183 (1927). — 10) ***D. R. Goddard, L. Michaelis,*** Study on keratin. Jl. of Biol. Chem., **106,** 605 (1934). S.A. — 11) ***M. Bergmann c.s.,*** Hochmolek. Aminosäureanhydr. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **445,** 1, 117 (1925); Zs. phys. Chem., **152,** 189 (1926). — 12) ***M. Bergmann,*** Probleme aus der Chemie der Eiweißstoffe (Vortrag). Zs. ang. Chem., **41,** 112 (1928). — 13) ***E. Abderhalden, R. Haas,*** Reakt. Prod. aus Glycylglycin. Zs. phys. Chem., **153,** 147 (1926).

so intensiv verfochtene Lehre für die Proteine; auch hier hat die „Kettentheorie" vollständig gesiegt. An den Proteinen selbst wurden nur wenige diesbzgl. Versuche gemacht, die Hauptsache leistete hier die enzymtypische Untersuchung an sich, eben der Nachweis der hydrolytischen Spaltung von Anfang an. Von Arbeiten an den Proteinen selbst fielen besonders die direkten Molgewichts-Bestimmungen SVEDBERG's (s. u.) und Röntgen-untersuchungen am Seidenfibroin (MEYER u. MARK **14)**) und später die von ASTBURY **14a)** in die Wagschale.

§ 457. Proteine als Polypeptid-Ketten. Sehen wir also von der noch völlig in der Luft hängenden Frage, ob es noch generell, d. h. charakteristisch für den Eiweißaufbau als solchen, wichtige besondere Strukturen gibt, nunmehr ganz ab, so zweifelt heute niemand mehr daran, daß das Eiweißmolekül, dieses Wort im Sinne STAUDINGER's betrachtet, also ohne Rücksicht auf die genaue Größe, aus längeren Ketten von aneinander gereihten Polypeptiden verschiedener Natur besteht, und daß weiterhin diese Moleküle hier zweifellos weiter aggregirt sind zu Gebilden höherer Ordnung, zu Micellen. Alle grundsätzlichen Fragen, ob man nun diese Ketten wirklich als „Moleküle" bezeichnen darf, oder ob man sie besser als Hauptvalenz-Ketten bezeichnet etc., sind hier genau dieselben wie bei den Polyosen und brauchen somit nicht nochmals erörtert zu werden. Als Aufbauschema der Proteine kann man also lange Ketten gemischter Polypeptide betrachten, und diese Ketten sind zu kolloiden Micellen associirt.

Mit diesen beiden Aussagen ist aber leider auch ziemlich Alles erschöpft, was wir über den Bauplan des kolloiden Proteinmolates aussagen können. Alles andere ist bisher grundsätzlich, nicht nur im Einzelnen, völlig unsicher. Folgende Hauptfragen stehen (abgesehen von den sog. „einfachsten" Proteinen, § 477) offen:

1) Wir wissen nichts über die Länge der einzelnen Ketten.

2) Wir wissen nichts darüber, ob diese einzelnen Ketten nur durch associative bzw. ionale oder auch durch Hauptvalenzkräfte untereinander gebunden sind.

3) Wir wissen nichts darüber, ob grundsätzlich alle in einem Molekül vorhandenen einzelnen Aminosäuren nun in einer Kette alle hintereinander einfach oder mehrfach gebunden sind, oder grundsätzlich nur Ketten von wenigen alternirenden Aminosäuren das Molekül bilden: die bunte Zusammensetzung der üblichen Proteine also nur auf Beziehungen strukturchemischer oder associativer Art zwischen den Ketten beruht.

Dargestellt sind bisher nur kurze Ketten von wenigen Aminosäuren, wie die Kyrine und einige einfache Peptone (H.W. S. 829), die höchstens — wenn sie einheitlich sind — 4-5 Aminosäuren in 8-10 Gliedern enthalten. Damit ist nichts anzufangen: sie können genau so gut Bruchstücke aus längeren Ketten derselben fortlaufenden Zusammensetzung sein, wie Bruchstücke aus Ketten anderer Fortsetzung, wenn z.B. die bei der Peptonbildung zweifellos erfolgende Herausnahme von Cystin oder Tyrosin nicht an einem Kettenende, sondern mitten in der Kette erfolgt.

Wir wissen also nur das Eine, daß die Ketten nicht homogen sind, sondern zum mindesten aus 4—5 verschiedenen Aminosäuren bestehen, und daran scheitern bisher alle Methoden, die bei den Polyosen schon so erhebliche Erfolge erzielt haben, weil sie sämtlich nur für homogene Ketten anwendbar sind, und sofort Schwierigkeiten ernster Art auftreten, wenn man auch nur an abweichende Formen der gleichen Zucker in den Ketten denkt, wie bei der Stärke.

---

14) ***K. H. Meyer, H. Mark,*** Aufbau des Seidenfibroins. Ber. Chem. Ges., **61,** 1932 (1928); Bioch. Zs., **208,** 1 (1929). — 14a) ***W. T. Astbury,*** X-Ray anal. of the struct. of animal hairs and other protein fibres. Trans. Faraday Soc., **29,** 193 (1933). S.A.

Wir können also nur vermuten, daß die Ketten der echten Proteine ziemlich lang sind, und diese Annahme eigentlich auch nur darauf stützen, daß für den ersten Angriff der genuinen Proteine besondere Enzymtypen nötig sind, während diese auf kürzere Polypeptidketten einschl. der einfacheren Peptone nicht wirken (wobei auch noch allerlei Unsicherheiten vorliegen, die „Peptone" sind auch enzymtypisch nicht einheitlich). Aber wo nun das „Molekül" aufhört und die „Micellbildung" beginnt, können wir hier nicht einmal der Größenordnung nach festlegen. Wir wissen also nicht, ob die Ketten so lang sind, daß sie schon in das Gebiet der Kolloide hineinreichen, oder ob die gesamte kolloide Struktur auf Micellbildung beruht. Man könnte annehmen, daß die von SVEDBERG (letzte Zusammenfassungen **15—18**)) mit so außerordentlicher Experimentirkunst festgelegten „Normalwerte" für die üblichen kolloidal löslichen Proteine einen Maßstab für das eigentliche „Molekül", d. h. die Länge der Hauptvalenz-Ketten abgeben, wenn SVEDBERG nicht selbst Befunde erhoben hätte, die auch diese Grundlage unsicher machen.

SVEDBERG hat bekanntlich für beinahe sämtliche löslichen Proteine ein normales Molgewicht von 34.500 festgelegt. Das einfache tritt selten auf (Ovalbumin, Insulin, Pepsin), meist findet sich das zweifache (Hämoglobin, Serumalbumin), drei- resp. sechsfache (die meisten Globuline), und dann folgen noch einige Riesenzahlen für die Blutfarbstoffe von Wirbellosen und besonders das Hämocyanin von *Helix*, die aber immer noch Zahlenrelationen erkennen lassen, da sie das 24-, 96- und 192-fache von 34.500 darstellen. Die Zahl von 35.000 für Ovalbumin fand auch SØRENSEN **19**), von 67.000 für Hämoglobin ADAIR **20**) mit osmometrischer Methode. GORTER c.s. **21**) bestätigten das Molgewicht 34.000 für Plasmaeiweiß durch Spreitungsversuche, die aber wieder für Hämoglobin nur den halben „Normalwert" = 16.000 ergaben.

Man könnte also zu der Annahme gelangen, die Zahl 34.500—35.000 wäre ebenso eine sichere untere Grenze, d. h. eine Zahl für die wirkliche Größe des Moleküls, wie sie mit ziemlicher Sicherheit als eine obere Grenze anzusehen ist. Alles was über 35.000 — allenfalls 70.000 — hinausgeht, deutet zweifellos nicht mehr auf „Molekül", sondern auf „Micell". Nach SØRENSEN **22**) sind die Proteine „*reversibel dissociable Komponentensysteme*", bei denen der einfache und umkehrbare Zerfall des Associats streng zu trennen ist von der nicht umkehrbaren Hydrolyse, also genau so wie SAMEC, aber auch STAUDINGER die genuine Stärke betrachten (vgl. S. 528) ASTBURY **14a**) hat diese Associationen auch mit der Kristallbindung mit Erfolg in Zusammenhang gebracht.

Das wäre also eine sehr schöne Lösung und würde ein Licht auf die tatsächliche lineare Ausdehnung der Hauptvalenzketten werfen, wenn nicht die Autoren selbst allerlei Beobachtungen gemacht hätten, die dafür sprechen, daß auch die Molg. von ca. 35.000 noch Molatgewichte sind. SØRENSEN fand im Gegensatz zu dem stabilen Ovalbumin Serumalbumin labil, schon beim Verdünnen gehen niedermolekulare, abiurete Stoffe vom Hauptanteil weg, die beim Konzentriren wieder gebunden werden. Ob das einfach Beimengungen — etwa in Symplexbindung — sind, oder ob das Molekül eben doch an sich kleiner ist, somit das anscheinend normale Molekül doch schon ein Micell, ist schwer zu sagen. Aber noch schwerer

---

15) ***The Svedberg***, Sedimentation constants, mol. weights, isoel. points of the resp. proteins. Jl. of Biol. Chem., **103**, 311 (1933). — 16) ***The Svedberg***, Sedimentationsmess. mit der Ultrazentrifuge. Naturwiss., **1934**, 225. — 17) ***The Svedberg***, Die Molekulargewichtsanalyse im Zentrifugalfeld. Koll. Zs., **67**, 2 (1934). — 18) ***The Svedberg***, Die Ultrazentrifuge u. ihr Verwendungsgebiet. Ber. Chem. Ges., **67**, **A**, 117 (1934). — 19) ***S. P. L. Sørensen c. s.***, Proteinstudien. Zs. phys. Chem., **106**, 1, 129 (1919). — 20) ***G. S. Adair***, Theory of Partial Osm. Press. a. Membrane Equilibria (Hämoglobin). Proc. Roy. Soc. London, **A 120**, 573, 600 (1928). — 21) ***E. Gorter, F. Grendel***, Eiweißausbreitung als Meth. zur Best. von Serumalbumin und Serumglobulin. Bioch. Zs., **201**, 391 (1928). — 22) ***S. P. L. Sørensen***, Proteinstoffe als reversibel dissoziable Komponentensysteme. Kolloid-Zs., **53**, 110 (1930).

wiegt, daß SVEDBERG beim genuinen Lactalbumin in der Milch selbst ein Molg. von nur ca. 1000 findet, das nach der Umfällung auf 12—25.000 ansteigt. Auch ROCHE 22a) rechnet mit Molekülen von 34500 und 17000. Das ist im Einzelnen noch garnicht zu deuten.

Es ist also trotz der SVEDBERG'schen Normalzahl immer noch möglich, daß diese — ja rein physikalisch aus der Sedimentation, also der Schwere der Einzelteilchen berechnete — Zahl eine Micellgewichts-Zahl ist, und die Hauptvalenz-Kette viel kleiner ist.

Auch die **Röntgen-Diagramme** helfen nicht viel weiter; ihre Ausdeutung ist allenfalls bei den einfachsten Proteinen möglich. So kommt K. H. MEYER 23) beim Seidenfibroin zu folgendem Aufbau: es ist ein kristallinisches Gebilde, bestehend in der Hauptsache aus Ketten von Glycin und Alanin in einer Ausdehnung von ca. 20 Gliedern; die anderen Aminosäuren sind ebenfalls hauptvalenzmäßig gebunden, aber so, daß sie keine brauchbaren Spektra geben. Diese verschiedenen Ketten sind zu „Mischmicellen" gebündelt. Für andere Proteine kann man nach MEYER 24) nur aussagen, daß die Ketten etwa 100mal so lang als dick sind, und daß sie nicht steif gestreckt sind, sondern ihre Form wechseln können. Ähnlich sind die Ergebnisse von GERNGROSS c.s. 25) an Gelatine. An sich ist auch Gelatine ein aus gebündelten Einzelketten bestehendes kristallinisches Micell; aber an den Kettenenden hören die Kräfte zwischen den Ketten auf; hier gehen die Bündel wirr durcheinander, bilden „Fransen", so daß Gelatine ein amorphes Gel ist. Demgegenüber ist beim genuinen Kollagen der Sehne die Kette scharf gestreckt und geschlossen, zeigt echte Faserstruktur; der Übergang von Kollagen in Glutin ist demnach an sich keine Hydrolyse, sondern nur eine Desaggregirung in diesem beschränkten Sinne, daß eben der Zusammenhang zwischen den Ketten gelockert wird, und diese an den Enden sich regellos ineinander lagern. Auf speciellere Beobachtungen an Keratinen (ASTBURY, l. c. 14a) kommen wir noch zurück (§ 477).

Wir können also die Frage nach der Kettenlänge nicht sicher beantworten; und damit auch die anderen Fragen nicht; denn die uns hier eigentlich am meisten interessirende, ob immer nur wenige Aminosäuren in einer Kette sind oder viele, hängt ja mit der absoluten Kettenlänge zusammen.

Enzymtypisch ist diese ganze Frage nicht so entscheidend wichtig, denn wir wissen, daß die Ketten jedenfalls so lang sind, daß die auf mittlere Polypeptidketten eingestellten Enzyme nicht mehr wirken. Es gibt nämlich bei den Proteasen im Gegensatz zu den Carbohydrasen noch — mindestens — eine Enzymgruppe, die auf mittlere Kettenlängen eingestellt ist (experimentell 3—5 Glieder), die verschiedenen Polypeptidasen, die von den Dipeptidasen ebenso scharf getrennt sind wie von den Proteinasen. Die Proteinasen also sind es, die das Micell des Proteins angreifen, aber nicht primär desaggregirend, sondern wie bereits erwähnt sofort hydrolytisch spaltend. Die Desaggregation des Micells ist hier genau wie bei den Polyosen eine secundäre und automatische Folge der hydrolytischen Verkürzung der Ketten. Selbst bei gleich stark bleibenden micellaren Kräften würde ja das Micell bei der Verkürzung der Ketten kleiner werden; aber dazu kommt als entscheidendes Moment eben die Verkleinerung der Kräfte selbst, so daß — wie bei der Stärke ja exakt nachweisbar — bei der enzymatischen Spaltung die Micelle sehr schnell an Größe abnehmen, bis schließlich der molekulardisperse Zustand eintritt.

Wenn man also reine Proteinasen wirken läßt, so tritt in jedem Fall irgendwo ein

---

22a) ***A. Roche,*** Poids moléc. des proteines. Bull. Soc. Chim. Biol., 17, 704 (1935). S.A. — 23) ***K. H. Meyer,*** Chemie der Micelle u. ihre Anwendung auf biochem. u. biolog. Probleme. Bioch. Zs., 208, 1 (1929). — 24) ***K. H. Meyer,*** Feinbau, Festigkeit u. Kontraktilität tierischer Gewebe. Bioch. Zs., 214, 254 (1929). — 25) ***O. Gerngroß, K. Herrmann, R. Lindemann,*** Reversible Sol-Gel-Umwandlung, „Kristallisation" d. Gelatine. Kolloid-Zs., 60, 276 (1932). S.A.

Angriff an den Ketten auf, gleichzeitig beginnt das Molat zu zerfallen, und dieser Abbau macht nun irgendwo auf dem Stadium der mittleren Polypeptid-Ketten halt. Wo dieser Angriffspunkt sitzt, der die so völlig verschiedene Wirkung der drei Proteinasen-Gruppen bedingt, und ob er auch strukturchemisch oder rein physiko-chemisch bedingt ist, wissen wir nicht, darüber Einiges §§ 460, 478 ff. Jedenfalls muß der erste Angriff verschieden sein; denn jede der drei Proteinasen-Gruppen wirkt noch auf die „Peptone", die durch die Wirkung der beiden anderen entstanden sind; es entstehen also verschiedene Abbaustufen, die noch irgendwie den Angriffspunkt für jeweils die beiden anderen Proteinasen aufweisen.

Was durch irgend eine reine Proteinase entsteht, ist das undefinirbare Gemisch von allerlei Abbaustufen, das man als „**Peptone**" bezeichnet. Es erhebt sich die Frage, ob dieses Gemisch nur aus an sich als „Polypeptide" verschiedener Kettenlänge zu definirenden Stoffen besteht, oder ob doch irgendwelche unbekannte Strukturbindungen zwischen den verkürzten Ketten weiter bestehen, welche die „Peptone" im strengsten Sinne von den Polypeptiden trennen würden. Wir können diese Frage nicht beantworten, da wir ja nicht wissen, ob solche Strukturbindungen in den Proteinen überhaupt existiren. Zum mindesten aber sind die Kettenlängen noch recht verschieden, was aus dem vielfältigen Verhalten der Peptone gegenüber den verschiedenen Enzymgruppen hervorgeht: sie werden als Ganzes sowohl von Proteinasen, wie von Polypeptidasen angegriffen, aber wechselnd; nur Dipeptidasen wirken garnicht. So ist also nicht zu verwundern, daß insbesondere bei den Arten von Peptonen, die man früher als „Albumosen" bezeichnet hat, und die durchschnittlich noch längere Ketten darstellen, auch noch Reste der Micellbildung bestehen, erkennbar an einem hemikolloiden Zustand. Die mangelnden Kenntnisse über den feineren Bau der Proteine machen also eine enzymtypische Schilderung des Abbaus nicht schwieriger, als sie ohnehin schon ist.

3) Das System der Proteasen.

§ 458. **Haupteinteilung.** Die Systematik der Proteasen ist seit dem Erscheinen des Hauptwerkes weitgehend geklärt worden. Wir verfügen heute über ein im Großen fest geschlossenes Einteilungsprinzip; und wenn noch Einzelheiten schwer zu deuten sind, so können sie kaum noch Überraschungen in sich bergen, welche weitgehende Umformungen nötig machen würden.

Das Hauptsystem (s. Grassmann, l. c. 1, 2) hat sich endgültig in der Richtung entwickeln lassen, die wir im H.W. S. 811 vorweggenommen haben. Das Gesamtgebiet der Proteasen zerfällt in zwei scharf getrennte Hauptgruppen, die nur die eigentlichen Proteine und ihre noch höher molekularen Derivate angreifenden **Proteinasen** (Grassmann **26**)), und die **Peptidasen** oder **Ereptasen**. Diese Scheidung und dementsprechende Benennung hat sich nach einigen Auseinandersetzungen (**27, 28**) durchgesetzt. Beide Gruppen haben nichts weiter mit einander zu tun, als daß sie eben häufig zusammen vorkommen, wie Amylase und Maltase auch. Fermente, die an sich die Proteine bis herunter zu den freien Aminosäuren abbauen, wie man es früher dem „Trypsin" zugeschrieben hat, gibt es nicht; diese ungeheure Verwirrung, die wir im

---

26) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff,*** Proteinase etc. der Hefe. Zs. phys. Chem., **179**, 41 (1928). — 27) ***E. Abderhalden,*** Bücherbespr. über „Ergebn. Enzymforsch." (Proteinasen). Ferm.-Forsch., **13**, 298, 453 (1932). — 28) ***W. Graßmann,*** Erwiderung (Proteinasen). Ferm.-Forsch., **13**, 451 (1932).

H.W. zwar mit allerlei guten Gründen bekämpfen, aber nicht beseitigen konnten, ist durch präparative Trennung der beiden Gruppen aus dem „Trypsin" sowohl wie aus den Gewebsfermenten der Tiere und Pflanzen endgültig aus der Welt geschafft. Sie alle enthalten betont eine, eben die ihnen zukommende Gruppe der Proteinasen und spalten die Proteine nur bis zu einer gewissen Stufe; dann setzen erst die verschiedenen Peptidasen ein, um über die Dipeptide hinweg schließlich die Aminosäuren selbst in Freiheit zu setzen. Die systematische Trennung und Aufarbeitung der verschiedenen Fermente hat eingesetzt mit der Lösung des historischen Problems von der komplexen Natur des „Trypsins" des Pankreas durch die Scheidung in einen tryptischen und einen ereptischen Anteil (WALDSCHMIDT-LEITZ 29)).

Den einzigen Schönheitsfehler dieser scharfen Gruppentrennung haben wir soeben berührt, er liegt in dem Ausdruck, daß die Proteinasen bis zu einer „bestimmten Stufe" abbauen. Leider können wir eben diese „Stufe" noch nicht chemisch scharf definiren. Es liegt dies daran, daß hier eben anders als bei den Polyosen nicht nur zwei Fermentgruppen tätig sind, sondern daß sich zwischen die Proteinasen und Dipeptidasen noch mindestens eine weitere Gruppe schiebt, die wir vorläufig als Polypeptidasen zusammenfassen, ohne ausschließen zu können, daß hier noch mehrere Gruppen vorhanden, aber noch nicht getrennt sind, deren Wirkung sich differenzirt nach der Länge der Ketten. Es hängt dies eben mit der enzymtypisch noch ganz unklaren Stellung der „Peptone" zusammen. Sie werden bald von Proteinasen, bald von Polypeptidasen gespalten (s. u. die Tabelle). Es ist nun möglich, daß alle Peptone nur Gemische sind von solchen kürzeren Ketten, die von wahren Polypeptidasen gespalten werden, also nur Gemische von echten Polypeptiden mit etwa 5—10 Gliedern (Teleopeptone nach WALDSCHMIDT-LEITZ); Gemische, die aber ausserdem noch verkürzte echte Proteinketten enthalten, die also nur den Proteinasen zugänglich sind. Das kann ebensowohl bedeuten, daß sie nur durch ihre Kettenlänge den Polypeptidasen nicht zugänglich sind, wie auch, daß sie noch die vermuteten, wenn auch vielleicht garnicht existirenden „besonderen Strukturen" tragen, die ein „Protein" von einer sehr langen einfachen Polypeptidkette unterscheiden würden. Es ist aber auch möglich, daß die Peptone an sich etwas Besonderes sind, wenn auch zweifellos wieder mit echten kurzgliedrigen Polypeptiden gemischt, eine Gruppe für sich, wahrhaft rein chemisch und dispersoidchemisch zwischen Protein und Polypeptid stehend; und dann könnte es auch eine dritte Hauptgruppe **Peptonasen** geben, die je nach der Präparation bisher bald an den Proteinasen, bald an den Polypeptidasen hängen geblieben ist. Wir wissen dies nicht, und es seien hier nur zwei Beobachtungen kurz angegeben, auf die am geeigneten Orte eingehender zurückzukommen ist: die längst bekannte Tatsache, daß Papain Peptone nicht angreift, dies aber nach seiner Aktivirung tut; und die neuere von NORTHROP 30), daß sein kristallisirtes actives Trypsin zwar Peptone (aus Casein und Gelatine), nicht aber höhere Polypeptide mit 5—6 Gliedern angreift, die aber von gewöhnlicher kinasirter Tryptase gespalten werden. Wenn also hier nicht im kristall. Trypsin eine Peptonase vorhanden ist, während die Carboxy-polypeptidase fehlt, die im gewöhnlichen vorhanden ist, so hätten wir auch hier die sonderbare Erweiterung der Specifitätsgrenzen durch Aktivirung. Diese offene Frage muß der Zukunft überlassen bleiben.

Sehen wir von dem Specialfall der Existenz oder Nicht-Existenz besonderer „Peptonasen" ab, so lassen diese Beobachtungen weiterhin vermuten, daß hier wie bei den Carbohydrasen die beiden Hauptgruppen nicht durch unübersteigliche Mauern von einander getrennt sind. Bei der Ähnlichkeit der reagirenden Gruppen, rein chemisch betrachtet, wird man eine Ähnlichkeit des Agons auch bei den Proteinasen und Peptid-

---

29) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck***, Trypt. u. erept. Wirk. der Pankreasdrüse. Zs. phys. Chem., **147**, 286 (1925). — 30) ***J. H. Northrop, M. Kunitz***, Wirk. des krist. Trypsins auf Pentaglycyl-glycin etc. Ferm.-Forsch., **13**, 597 (1933).

asen vermuten dürfen, und somit die weitgehende Verschiebung der Specifität auf Verschiebungen am Pheron zurückführen *).

Dafür könnte man wie gesagt auch diese Verschiebungen bei der Aktivirung heranziehen; fernerhin einige Beobachtungen von ABDERHALDEN **31)**, daß in rein wirkender Tryptase Erepsinwirkungen von selbst beim Stehen auftreten oder künstlich durch gewisse Zusätze von Aminosäuren hervorgerufen werden können; — obgleich es sich hier viel wahrscheinlicher um inaktivirende Symplexbindung der vorhandenen Dipeptidasen handelt, die durch solche Eingriffe gelöst wird. Endlich sei der Ausnahmefall schon hier erwähnt, daß nach MATSUI **32)** aktivirtes Trypsin einige definirte Polypeptide der Asparaginsäure angreift; seltsamerweise sind gerade einige synthetische Dipeptide der Asparaginsäure gegen Dipeptidase ziemlich resistent, was auf eine besondere Stellung dieser Aminosäure im Proteinmolekül hindeuten könnte (BERGMANN **33), 34)** u. a.).

Eine Art Grenzstellung nimmt auch die von WALDSCHMIDT-LEITZ **35)** entdeckte spezifische **Protaminase** ein, die nur eine endständige Arginin-gruppe abspaltet; die Protamine an sich sind ja keine echten Proteine, sondern eher den Peptonen zuzurechnen. Wir werden das Enzym bei den Carboxy-Polypeptidasen mitbehandeln; es ist im Pankreastrypsin enthalten, aber noch nicht abgetrennt.

§ 459. **Peptidasen.** Gehen wir nun zu der Unterteilung der beiden Hauptgruppen über, so ergibt sich diese im Großen bei den Peptidasen von selbst. Es gibt wieder zwei Hauptuntergruppen nach der Länge der Polypeptide. Eine völlig einfache, in sich geschlossene und einheitliche Gruppe spaltet nur Dipeptide, die **Dipeptidasen.** Sie wurde zuerst bei der Hefe von GRASSMANN **36)** aus dem Gemisch herausgeholt, dann auch bei tierischen Peptidasen isolirt (WALDSCHMIDT-LEITZ **37)**). Ein und dasselbe Enzym spaltet alle Dipeptide natürlicher echter Aminosäuren mit wenigen Ausnahmen, wie einige Dipeptide von Lysin und Asparaginsäure (BERGMANN **33, 34)**); und zwar durch eine spezifische Affinität zur freien Aminogruppe.

Auf gewisse Bedenken gegen diese Ausschließlichkeit, Resistenz gewisser Polypeptide, Versuche zur Unterscheidung verschiedener Dipeptidasen etc. kommen wir im speciellen Teil zurück; ebenso auf die Fälle, bei denen eine Aufteilung der Peptidasen bisher überhaupt nicht gelungen ist (Malz, Magenschleimhaut).

Abgesondert von den echten Dipeptidasen stehen die Enzyme, welche die Dipeptide des Prolins spalten, das ja keine Aminosäure ist (GRASSMANN, BERGMANN). Bei der Spaltung der Peptide, bei denen Prolin an seinem N das Carboxyl einer anderen Aminosäure bindet, wie

---

*) Es sei hier nur kurz bemerkt, daß eine solche Annahme genau so gut mit der Vorstellung verträglich ist, daß das Agon mit dem Pheron nur im Symplex gebunden (WILLSTÄTTER-KRAUT), wie mit der, daß das Agon ein Strukturbestandteil des größeren Pheron ist, wenn man mit NORTHROP die Proteasen als Proteine im strengsten Sinne betrachtet. Zu dieser hochinteressanten Diskussion brauchen wir also hier durchaus nicht Stellung zu nehmen.

31) ***E. Abderhalden, E. v. Ehrenwall,*** Frage der Einheitl. von ... Trypsinlösungen. Ferm.-Forsch., **12**, 411, **13**, 47 (1931/2). — 32) ***J. Matsui,*** Konst. der Polypeptide u. proteol. Ferm. Jl. of Biochem., **17**, 163 (1933). S.A. — 33) ***M. Bergmann,*** Aufgaben der Synth. f. die Erforsch. der Eiweißst. etc. Naturwiss., **1932**, 941. — 34) ***M. Bergmann, L. Zervas,*** Wirkungsweise etc. der Dipeptidase. Zs. phys. Chem., **224**, 11 (1934). — 35) ***E. Waldschmidt-Leitz c. s.,*** Protaminase. Zs. phys. Chem., **197**, 219 (1931); **222**, 148 (1933). S.A. — 36) ***W. Graßmann,*** Dipeptidase u. Polypept. der Hefe. Zs. phys. Chem., **167**, 202 (1927). — 37) ***E. Waldschmidt-Leitz c. s.,*** Dipeptidase u. Polypept. aus Darmschleimh. Ber. Chem. Ges., **62**, 956 (1929). — 37a) ***M. Bergmann c.s.,*** Proteol. Ferm. Zs. phys. Chem., **212**, 72; Ber. Chem. Ges., **65**, 1747 (1932). S.A. — 38) ***W. Graßmann c. s.,*** Enz. Spaltbark. der Prolinpeptide. Ber. Chem. Ges., **62**, 1307 (1929); Zs. phys. Chem., **210**, 1 (1931), **214**, 104 (1933). S.A.

z.B. Glycyl-prolin, durch **Prolin-peptidase (37a)**) entsteht natürlich keine freie Amino-, sondern eine Imino-Gruppe, was also andere Specifitäten voraussetzt; aber auch die umgekehrten Dipeptide wie Prolyl-glycin, sind nur durch Specialfermente spaltbar (**Prolyl-peptidase**, GRASSMANN **38**)), Specialfermente, die nur dehydrirte Peptide spalten, haben BERGMANN c.s. **39**) aufgefunden.

Diese ungemein weitgespannte Specifität der Dipeptidasen, die sich unbeschadet der speciellen chemischen Natur der einzelnen Aminosäuren auf alle Dipeptide zum mindesten der normalen einbasischen Aminosäuren erstreckt, ist recht auffallend im Hinblick auf die strenge Specifität der Oligasen. Es ist eine erstaunliche Anpassung an biologische Notwendigkeiten, denn im Gegensatz zu den Polyosen, die ganz verschiedene Mandate zu erfüllen haben, sind die Proteine — von wenigen Fällen abgesehen — von der gleichen biologischen Dignität.

Polypeptidasen. Diese Anpassung eines einheitlichen Enzyms an die verschiedenartigsten Substrate gilt aber nur für die Dipeptidasen; denn gegenüber ihrer Geschlossenheit zeigt die auf die höheren Polypeptide, von den dreigliedrigen an, eingestellte Untergruppe der Polypeptidasen eine erstaunliche Mannigfaltigkeit. Es hat auch durchaus den Anschein, als ob die heute bereits erkannten Typen nicht die einzigen wären; insbesondere scheinen hier Abweichungen in den Strukturen mehr Specialfermente zu verlangen, als man bisher sichergestellt hat (s. a. **39a**)).

Zunächst folgt die Einteilung der Polypeptidasen nicht dem Strukturprincip der Substrate. Es ist nicht etwa für bestimmte Gruppierungen je ein Sonderferment nötig, sondern sie unterscheiden sich zunächst bei gleichem Substrat nach dem specifischen Angriffspunkt. Wir trennen zunächst die Polypeptidasen in die beiden Teilgruppen der **Amino-polypeptidasen** und **Carboxy-polypeptidasen**. Die erstere hat wie die Dipeptidasen ihren specifischen Angriffspunkt an der freien Aminogruppe und spaltet aus den höheren Peptiden die Gruppe der Aminosäure mit freiem NH_2 ab. Substitutionen und sonstige Veränderungen an dieser Aminogruppe schalten die Wirkung aus. Diese Enzyme sind dementsprechend saurer Natur, wie aus ihrem Adsorptionsverhalten hervorgeht.

Dagegen setzen die Carboxy-polypeptidasen am freien Carboxyl an und spalten aus den Peptiden die Gruppe am Carboxyl-ende ab. Substitution an der Aminogruppe stört nicht; Aufhebung der freien Carboxylgruppe hebt die Wirkung auf. Diese Enzyme zeigen wie die Tryptase eine weniger saure Natur; sie zeigen ein anderes Adsorptionsverhalten. Dadurch können sie getrennt werden.

Diesen Wirkungsprincipien entsprechen nun auch andere Eigenschaften der Enzyme selbst. Es gehören auch äußerlich Dipeptidasen und Amino-polypeptidasen zusammen, während die Carboxy-polypeptidasen sehr nahe verwandt sind den zugehörigen Proteinasen.

So z.B. gehen aus dem rohen Pankreasextrakt an Tonerde $C\gamma$ bei ph = 4 gemeinsam (als „Pankreas-Erepsin") Dipeptidase + Aminopolypeptidase, während das „Pankreas-Trypsin", bestehend aus der eigentlichen Proteinase + Carboxypolypeptidase, nicht adsorbirt wird. Die erste Gruppe kann dann weiter zerlegt werden durch $Fe(OH)_3$ bei ph = 4, die andere durch Tonerde $C\gamma$ bei ph = 7,0 (WALDSCHMIDT-LEITZ **40**)). Es ist also die Carboxy-polypeptidase der Tryptase innig gesellt und ihr sehr ähnlich; sie zeigt sogar die für letztere so überaus

39) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Enzym. Spalt. dehydr. Polypeptide. Zs. phys. Chem., **205**, 65, **207**, 235 (1931/2). S.A. — 39a) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Anw. von Enz. zur Konst.-Emittl. der Proteine. Erg. Phys. **35**, 415 (1933). S.A. — 40) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Proteinase u. Carboxy-polypeptidase. Ber. Chem. Ges., **62**, 2217 (1929). S.A.

charakteristische Aktivirung durch Enterokinase, wenn auch ihre Wirkung nicht absolut abhängig davon ist (**40**)). Diese Carboxy-polypeptidase findet sich auch sonst als Begleiter der Tryptase, und anscheinend auch im Hefentrypsin (GRASSMANN, l. c. 1, S. 186).

Man könnte also vermuten, daß diese beiden Enzyme auch chemisch verwandt sind, zum mindesten ein ähnliches Pheron haben, und daß auch die specielle Affinität zur Säuregruppe, die wir auch der Tryptase als Grundwirkung zuschreiben dürfen — sie wirkt ja nur auf anionisches Eiweiß — mit dieser inneren Ähnlichkeit zu erklären wäre. Aber das stimmt nicht, denn auch die dem Kathepsin (aus der Gruppe der Papainasen) zugeordnete Carboxy-polypeptidase ist ebenso ihrer zugehörigen Proteinase sehr ähnlich, trotzdem diese durchaus nicht auf anionisches Eiweiß wirkt, sondern auf annähernd isoelektrisches Eiweiß (s. u.). Aber auch hier wieder ist diese Carboxy-polypeptidase der Proteinase sehr innig gesellt, die Trennung durch selektive Adsorption ist bisher nur einseitig gelungen; man kann zwar Kathepsin von seiner Carboxy-polypeptidase befreien, aber nicht umgekehrt (WALDSCHMIDT-LEITZ **41**)). Wie das Kathepsin selbst hat auch die ihm zugeordnete Carboxy-polypeptidase ein wesentlich mehr im Sauren gelegenes ph-Optimum als die entsprechenden Enzyme des tryptischen Systems. Auch die Aktivirungserscheinungen sind die gleichen: HCN und Thiole aktiviren, Enterokinase nicht (**41**). Es bestehen also grundsätzliche und von der speciellen Wirkungsart der Proteinase unabhängige enge Beziehungen zwischen den Carboxy-polypeptidasen und ihren zugehörigen Proteinasen. Sie deuten auch auf genetische Zusammenhänge, die noch kaum bekannt sind. Es sieht so aus, als ob die Carboxy-polypeptidasen sich erst bei Tieren von der Gewebsprotease abgezweigt haben; denn weder die Hefenprotease, noch das Papain enthalten kathept. Carboxy-polypeptidase (GRASSMANN, l. c. 1., S. 199), während sie bei höheren Wirbellosen schon vorkommt (*Maja squinado Latr.*, MANSOUR-BEK **42**)).

Mit diesem Hinweis auf die beiden Carboxy-polypeptidasen des Pankreas-trypsins und des Kathepsins haben wir nun die weitere Aufteilung der Gruppe der Polypeptidasen begonnen. Diese ist noch nicht beendet, weitere Teilfermente sind bereits so gut wie sicher, und es werden wohl, wie besonders ABDERHALDEN annimmt, noch mehr folgen (s. a. **39a**)).

Diese Weiterteilung vollzieht sich wieder nach zwei Principien. Erstens nach dem soeben erwähnten der isodynamen Fermente, also gleicher Endwirkung, aber von verschiedenen Eigenschaften. Das ist die Differenzirung der bisher zwei Carboxy-polypeptidasen nach den ihnen zugeordneten Proteinasen; vielleicht werden doch noch weitere aufgefunden. Bei der Aminopolypeptidase — die auch in Hefe vorkommt — sind solche Differenzirungen noch nicht aufgefunden worden, sie gilt bisher für ein einheitliches Enzym.

Weiter aber beginnen Unterteilungen nach den Strukturen. Nach ABDERHALDEN **43**) gibt es besondere Carboxy-polypeptidasen, je nachdem die endständige Gruppe mit dem die Affinität bedingenden Carboxyl Leucin oder Tyrosin ist. Das ermöglicht eventuell eine Einordnung auch der Protaminasen (l. c. 35), die dann „Arginin-peptidasen" wären (GRASSMANN l. c. 2, S. 479).

Weiter aber gibt es anscheinend noch Specialfermente für acylirte Peptide, welche die freien nicht angreifen. Diese führen nun direkt über zu den einfachen Acylamidasen, wie z.B. das Enzym aus Pankreas-Erepsin, das Chloracetyl-alanin zerlegt, und in seiner Wirkungsart an die Hippuricase erinnert (ABDERHALDEN **44**)); sowie die „Polypeptidase" des Papains (BERGMANN, S. 594). Das Gebiet befindet sich also noch im vollen Fluß, es werden wohl noch mehr verschiedene und verschiedenartig differenzirte Polypeptidasen auftauchen; eine weitere Klärung bedarf eines ungemein großen Arbeitsaufwandes der

---

41) ***E. Waldschmidt-Leitz c. s.***, Proteol. System in tier. Organen. Zs. phys. Chem., **188**, 17 (1930); Naturwiss., **1930**, 644. — 42) ***I. I. Mansour-Bek***, Proteol. Enz. von Maja squinado. Zs. vgl. Phys., **17**, 153 (1932). S.A. — 43) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Spec. Einstell. der Polypeptidasen. Ferm.-Forsch., **12**, 432, 559 (1931). — 44) ***E. Abderhalden c. s.***, Einheitl. des Trypsinkomplexes. Ferm.-Forsch., **10**, 478, **12**, 223, 376, 395, 559, **13**, 408 (1930—3).

Herstellung und Prüfung verschiedenartiger Enzympräparate aus verschiedenen Quellen an unzähligen vielfach variirten Polypeptiden. Auf diese Specialforschungen kommen wir im speciellen Teil „Peptidasen" zurück; für die Begründung einer Systematik geben die bisher festgelegten Typen genügend Material, so daß wir unsere oberflächliche Orientirung hier damit abschließen können.

§ 460. Proteinasen sind die Fermente, welche die nativen Eiweißkörper einschließlich eines wesentlichen Teiles der noch unentwirrten und undefinirbaren höheren Zwischenprodukte, der „Peptone", in definirte Polypeptide spalten. Eine nähere Aufklärung, was denn eigentlich die echten Proteinasen leisten, steht noch in weitem Felde, und so müssen wir uns mit dieser noch höchst oberflächlichen Definition begnügen. Es fehlt eigentlich noch an Allem. Wir wissen bisher weder chemisch, — von der ganz allgemein gehaltenen physiko-chemischen Charakterisirung vorerst abgesehen —, warum es drei gesonderte Gruppen von Proteinasen gibt, noch was beim ersten Angriff der Proteine vor sich geht, abgesehen von der einen höchst wichtigen Tatsache, daß dieser erste Angriff in jedem Falle bereits eine Hydrolyse an der CO-NH-Bindung ist und der wahrscheinlichen Annahme (s. LINDERSTRØM-LANG **39a)**), daß die Proteinasen im Gegensatz zu den Peptidasen in der Mitte der Ketten spalten.

Wir wissen nur, daß das, was nach diesem ersten Angriff, also nach der Wirkung peptidasefreier Proteinasen übrig bleibt, nach den 3 Fermentgruppen verschieden ist, auch enzymtypisch verschieden, daß also die 3 Gruppen irgendwie verschieden arbeiten. Das geht schon daraus hervor, daß sowohl Pepsin nach Trypsin, wie Trypsin nach Pepsin noch Wirkungen ausübt (§ 478a), und ebenso Papainasen nach beiden. Man kann sich mangels jeglicher Kenntnis ebensogut vorstellen, daß alle bisher präparativ abgetrennten Proteinasen noch Gemische verschiedener Stufen-Fermente sind (einschließlich der möglicherweise vorhandenen Peptonasen), wie daß es bestimmte Strukturverhältnisse der Substrate resp. der Angriffsgruppen sind, welche die Verschiedenheiten der Enzyme bedingen. So scheint nach neuen Untersuchungen BERGMANN's **44a)** das Papain ganz andere Affinitäten zu haben als Pepsin und Trypsin, nämlich zu zwei benachbarten Amidgruppen (§ 479). Ebenso wissen wir generell noch nicht, ob es innerhalb der einzelnen Hauptgruppen noch substratspecifische Enzyme gibt, oder ob jede Gruppe alle angreifbaren Proteine durch ein einheitliches Ferment spaltet.

Die Ansichten darüber haben mehrfach gewechselt; in jüngster Zeit wird wieder von einer so autorativen Seite wie NORTHROP **45)** eine specifische Gelatinase (im Rohpepsin) angenommen, während eine analoge, aber alkalisch wirksame Kollagenase im Pankreas (SSADIKOW **46)**) und im Darm der Fliege *Lucilia* gefunden ist **(46a)**. Umgekehrt wirkt nach NORTHROP und KUNITZ (l. c. 30) die ganz reine Tryptase nur auf genuine Proteine, schon auf Casein und Gelatine schwach (s. u.). Auf einem anderen Blatt stehen Entdeckungen von Enzymen, die auf bisher unangreifbare besondere Proteine wirken sollen, wie die Keratinase im Kropfsaft von Raubvögeln **(47)** *). Und wieder ein ganz großes und durchaus noch nicht

*) Auch Kleidermotten verdauen Keratin; aber hier liegt nach LINDERSTRØM-LANG **47a)** die Sache anders. Der Darmsaft von *Tineola* verdaut Keratin nur, wenn es vorher reducirt ist, also im Sinne von GODDARD und MICHAELIS (l. c. 10) ohnehin zu einem ganz normalen enzymempfindlichen Protein aufgespalten ist (Näh. § 478).

44a) ***M. Bergmann c.s.***, Spec. of papain. Jl. of biol. Chem., **111**, 225, 245, 659 (1935). — 45) ***J. H. Northrop***, Pres. of a gelatine liqu. enz. in crude pepsin. Jl. of Gen. Phys., **15**, 29 (1931). S.A. — 46) ***W.S. Ssadikow***, Neues kollagenlös. Ferm., Kollagenase. Bioch. Zs., **181**, 267 (1927). — 46a) ***R. P. Hobson***, Enzyme from blow-flie larvae, wh. dig. collagen etc. Biochem. Jl., **25**, 1458 (1931). — 47) ***R. Stanković c. s.***, Enzym. Hydrol. des Keratins etc. Zs. phys. Chem., **181**, 291 (1929). — 47a) ***K. Linderstrøm-Lang, F. Duspiva***, Verdau. von Keratin durch die Larven der Kleidermotte. Zs. phys. Chem., **237**, 131 (1935). S.A.

erhelltes Gebiet sind Proteinasen artspecifischer oder organspecifischer Natur, wie sie besonders durch die Abwehrfermente von ABDERHALDEN gekennzeichnet sind, über die er neuerdings wieder gegenüber aller Kritik zusammenfassend berichtet hat (z.B. **48)**).

Und endlich gibt es noch die vielen und hier nicht im Einzelnen zu behandelnden Fälle, daß die 3 Gruppen ganz verschieden wirken in bezug auf die Auswahl ihrer Substrate, daß Pepsin viele Proteine schnell aufspaltet, die gegen Trypsin praktisch resistent sind, wie z.B. Serumalbumin u.a., und daß die Wirkung der Papainasen auf genuine Proteine überhaupt schleppend ist. Die umgekehrte Resistenz der Protamine gegen Pepsin soll dagegen hier nicht betont werden; denn die Protamine sind eben schon wegen ihrer Einfachheit keine echten Proteine, und gehören überhaupt enzymtypisch zu den „Peptonen" denn auch diese sind in allen Spielarten gegen Pepsin resistent.

Die drei großen Hauptgruppen der Proteinasen sind: Pepsinasen, Tryptasen und Papainasen, wie WALDSCHMIDT-LEITZ **49)** nach dem historisch zuerst bekannten Enzym der WILLSTÄTTER'schen „dritten Gruppe" diese rationell benannt hat. Von diesen ist am einfachsten die Gruppe der **Pepsinasen** zu definiren, sowohl durch Einheitlichkeit wie Präzision der Wirkung. Es gibt wahrscheinlich überhaupt nur ein Pepsin, das des Magens aller Tiere, die einen wahren Magen haben.

Alle anderen Annahmen sind entweder widerlegt, wie die „Gewebspepsinasen" bei Tieren und Pflanzen, oder sehr zweifelhafte Grenzfälle, wie das „Pepsin" der insectivoren Pflanze *Drosera*, das viel wahrscheinlicher eine Papainase mit einem ins Saure verschobenen ph ist, als ein Pepsin (**50, 51**). Es liegt hier also nicht viel anders als bei den von VINES für die Pflanzen überhaupt und von DERNBY für die tierischen Gewebe postulirten „Pepsinasen", die eben nicht Pepsine mit nach alkalisch verschobenem opt. ph sind, sondern eine eigene „dritte Gruppe" WILLSTÄTTER's, die er bei Tieren als Kathepsine bezeichnet, und die als ganze Gruppe eben jetzt Papainasen heißen.

Relativ exakt definirbar ist auch die Wirkung des Pepsins. Es greift bei einem beispiellos niedrigen ph (Opt. = 2) alle überhaupt angreifbaren Proteine an, sowohl die echt genuinen, wie die schon erheblich abgewandelten (Caseinogen, Glutin), und zwar nur eben zu Peptonen. Kein wahres Pepton auch anderer Herkunft (chemische Hydrolyse) und ebenso kein einziges Polypeptid irgend welcher Art ist dem Pepsin zugänglich. Aus seinem opt. ph etc. kann man erschließen, daß es nur kationisches Protein („Säure-Eiweiß") angreift (NORTHROP, H.W. S. 954; s. a. GIRARD **51a)**); es wirkt ferner sehr schnell, und beseitigt in sehr markanter Weise die Hindernisse, die bei einigen genuinen Proteinen die Wirkung der beiden anderen Gruppen ausschalten. Eine ganz kurze Pepsinwirkung genügt, um beispielsweise Serumalbumin nun durch Tryptase ganz leicht abbaufähig zu machen. Die Ursache ist wohl die starke positive Aufladung, welche die Ketten auseinander drängt (§§ 477, 478).

§ 461. **Tryptase.** Im Gegensatz zu dieser klaren und eindeutigen Stellung des Pepsins sind die Fragen um die Tryptase herum noch durchaus nicht bereinigt. Schon mehrfach hat man geglaubt, „reine" Tryptase (d. h. natürlich wirkungsreine) in Händen gehabt zu haben, und dann hat sie sich doch wieder als Gemisch mehrerer Specialfermente herausgestellt.

Der Tryptase als Sammelbegriff gemeinsam ist, daß sie eine Affinität zur Car-

---

48) ***E. Abderhalden,*** Gegw. Stand der Erforsch. der Abwehrferm. etc. Schweiz. Med. Jahrb., 1933. S.A. — 49) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Vorträge aus dem Geb. der Eiweißchemie, Leipzig 1931, S. 59. — 50) ***K. G. Stern, E. Stern,*** Proteinasen insectivorer Pflanzen. Bioch. Zs., **252**, 81 (1932). — 51) ***H. Holter, K. Linderstrøm-Lang,*** Proteasen von Drosera. Zs. phys. Chem., **214**, 223 (1933). S.A. — 51a) ***P. Girard,*** Méc. de l'act. des diast. protéol. Bull. Soc. Chim. Biol., **8**, 30 (1926).

boxylgruppe hat, bei schwach alkalischem ph optimal wirkt, genuine Proteine relativ langsam angreift, und auf anionisches Eiweiß („Alkali-Eiweiß") eingestellt ist (NORTHROP). Ferner ist charakteristisch für sie die Aktivirung durch ein speciell zugeordnetes anscheinend wahres Co-ferment, die Enterokinase, wenn auch gelegentlich bereits voll aktivirte Tryptase vorkommt (Leukocyten, *Pinguicula*). Pankreastryptase ohne Co-Enzym ist völlig inaktiv (WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR, l. c. 40). Sehr bedeutungsvoll ist aber der Befund von NORTHROP **52)**, daß bei der Präparation seines kristallisirten Trypsins eine volle Aktivirung eintritt, so daß Enterokinase nicht mehr wirkt. Darauf kann hier natürlich nicht näher eingegangen werden.

Biologisch ist sie charakterisirt durch ihr vereinzeltes Vorkommen. Ihre Hauptquelle ist das Pankreas der Wirbeltiere; ferner findet sie sich in Leukocyten (WILLSTÄTTER **53)**) und Milz (HEDIN **54)**); wahrscheinlich auch in anderen Geweben, wenn auch bei diesen zweifellos das Hauptferment Kathepsin ist. Die nachweisbare Tryptase könnte auf die überall vorhandenen Leukocyten zu beziehen sein. Lymphocyten scheinen kaum Tryptase zu besitzen. Bei Wirbellosen kommt im Gegensatz zu früheren Annahmen Tryptase vor (Magensaft von *Maja Squinado Latr.*, MANSOUR-BEK, l. c. 42). In pflanzlichen Geweben fehlt sie absolut, kommt dagegen im Verdauungssaft insectivorer Pflanzen (*Nepenthes, Pinguicula*) vor (GRASSMANN **55)**, STERN l. c. 50, HOLTER l. c. 51); für *Nepenthes* als bakteriell bestritten **(56)**). Bei Hefen etc. fehlt sie, bei Bakterien ist ihr Vorkommen zweifelhaft.

Das „Trypsin" des Pankreas, das früher als ein einheitliches Ferment angesehen wurde, ist dann zuerst von WALDSCHMIDT-LEITZ **57)** in ein „Erepsin" und ein „Trypsin" zerlegt worden. Die ereptische Komponente wurde dann weiter zerlegt in die inzwischen bei der Hefe beobachteten Gruppen der Dipeptidase und Aminopolypeptidase. Dagegen stellte sich erst später heraus, daß auch das so definirte „Trypsin" nicht einheitlich war, da man aus ihm noch durch selektive Adsorption die Carboxy-polypeptidase isoliren konnte (s. o.).

Aber auch diese Tryptase ist noch nicht einheitlich. Erstens enthält sie noch immer die Protaminase (l. c. 35), die nicht abgetrennt werden konnte, und nur an ihrer Unabhängigkeit von Enterokinase etc. und ihrer isolirten Wirksamkeit erkannt wird. Dies ist hier nicht so wichtig, weil man die Protaminase noch eher zu den Carboxy-polypeptidasen rechnen kann, als zu den Proteinasen; ebenso sind wohl auf Peptidasen im „Trypsin" die Beobachtungen von NORTHROP (l. c. 30) zu beziehen, daß sein kristallisirtes Trypsin (das wie oben erwähnt an sich voll aktivirt ist) definirte höhere Peptide im Gegensatz zu den üblichen Trypsin-kinase-präparaten nicht angreift. Aber die eingehenden Studien von NORTHROP über sein kristallisirtes Trypsin, auf die wir natürlich erst im speciellen Teil eingehen können, deuten darauf hin, daß dieses auch in bezug auf die Proteinasen an sich eine erheblich eingeengte Specifität besitzt. In diesem Trypsin ist nur eine „Proteinase" im strengsten Sinne des Wortes vorhanden, die specifisch auf wahre genuine Proteine wirkt, schon anders auf z.B. Caseinogen. So zeigte z.B. NORTHROP **58)**, daß dieses Reintrypsin eine Komponente der üblichen Trypsin-Kinase nicht enthält: ein **Chymotrypsin** mit betonter Labwirkung auf Casein, die beim kristallisirten Trypsin sehr schwach ist. Auch die Hydrolyse von Caseinogen ist weitergehend als durch Trypsin. Dieses Chymotrypsin entsteht aus einer inaktiven Vorstufe, einem Protein, durch Zusatz ganz kleiner Mengen von aktiver Tryptase.

52) ***J. H. Northrop, M. Kunitz,*** Isol. and properties of cryst. trypsin. Erg. Enzymf. II, 104, Leipzig 1934 (Einzellit. im Spec. Teil). — 53) ***R. Willstätter, E. Bamann, M. Rohdewald,*** Proteol. Wirk. farbl. Blutkörp., Trypsin der Leucoc. Zs. phys. Chem., **185,** 267, **188,** 107 (1929/30). — 54) ***S. G. Hedin,*** Proteol. Milzenzyme. Zs. phys. Chem., **188,** 261 (1930). — 55) ***W. Graßmann,*** Specif. proteolyt. Pflanzenenzyme. Habil. Schr. München, 1928, S. 46. S.A. — 56) ***I. de Zeeuw,*** Verdauung in Nepentheskannen. Bioch. Zs., **269,** 187 (1934). — 57) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Hartenеck,*** Trypt. u. erept. Wirk. d. Pankr. Zs. phys. Chem., **147,** 286, **149,** 203 (1925). — 58) ***M. Kunitz, J. H. Northrop,*** Isol. of cryst. proteases from pancr. etc. Science, **78,** 558 (1933). S.A.

WALDSCHMIDT-LEITZ 59) konnte bestätigen, daß ein Gemisch von NORTHROP-Trypsin mit Chymotrypsin ebenso wirkt wie seine eigenen hochgereinigten Trypsin-kinase-präparate. Die Protaminase ist auch im kristallisirten Trypsin noch enthalten, das aber weitergehend auf Clupean wirkt. Wahrscheinlich ist auch dieses Präparat noch ein System mehrerer Proteinasen. WALDSCHMIDT-LEITZ konnte auch aus seinem Pankreastrypsin das Chymotrypsin durch Adsorption abtrennen (Tonerde A).

Papainasen. Diese „dritte Gruppe" WILLSTÄTTER's umfaßt nun alle übrigen Proteinasen, soweit sie nicht zu den Pepsinasen oder Tryptasen gestellt werden können. Es sind dies summarisch betrachtet, alle Gewebsenzyme bei Tieren und Pflanzen (mit Ausnahme der Bakterien) und die Sekretfermente der wirbellosen Tiere. Ihre Haupt-differenzirung beruht auf zwei Eigenheiten: einerseits auf ihren eigenartigen Aktivirungs-erscheinungen durch Thiole und dgl., die weit über diese specielle Frage hinaus wichtig sind (vgl. die Bemerkungen bei Arginase, § 438), andererseits auf ihrer speciellen Affinität zum ungeladenen, isoelektrischen Eiweiß; dieser Umstand bewirkt es, daß der opt. ph in weiten Grenzen schwankt je nach dem Substrat, da er eben ungefähr bei dessen isoelektrischem Punkt liegt. Und dies hat natürlich wesentlich dazu beigetragen, die feste Umgrenzung dieser Gruppe zu erschweren, da eben der opt. ph manchmal bis nahe an den der Pepsinasen, manchmal an den der Tryptasen heranreicht. Daß nach BERGMANN diese Wirkung auf einer ganz besonderen Affinität beruht, haben wir (l. c. 44a) erwähnt. Die tierischen Gewebsproteinasen, die WILLSTÄTTER 60) unter dem Namen **Kathepsin** zusammenfaßt, haben im Durchschnitt einen mehr ins Saure verschobenen opt. ph; jedoch ist das noch nicht über allen Zweifel erhaben, weil die bisher untersuchten Präparate noch nicht wirkungsrein waren; sie enthielten noch die Carboxy-polypeptidase, die ja den pflanzlichen Papainasen fehlt. Es ist also durchaus noch möglich, daß dieser Unterschied — der ja im übrigen auch sonst vielfach bei gruppenidentischen Enzymen auftritt — auch noch wegfällt, und wir das tierische Kathepsin als mit dem pflanzlichen **Papain** für gruppenidentisch ansehen können: Papain ist seinerseits die einzig wichtige pflanzliche Papainase, vielleicht das einzige pflanzliche Gewebsferment überhaupt, — mit Ausnahme der Bakterien, bei denen wie beinahe immer besondere Komplikationen auftreten. Die nahe Verwandtschaft aller dieser Enzyme ergibt sich aus ihrer Wirkung: wenn man aktivirtes Papain hat zu Ende wirken lassen, so werden die so erzeugten Peptone weder durch Hefenproteinase noch durch Kathepsin weiter zerlegt, im Gegensatz zu Pepsin- oder Trypsin-peptonen. Alle typischen Papainasen wirken also bis zum gleichen Endpunkt. (Näheres § 478a).

Diese Eigenart des wechselnden ph hat dazu geführt, die Papainasen früher für Enzymgemische zu halten, wie wir im H.W. eingehend erörtert haben. VINES hatte in Pflanzen „Peptasen", d. h. Pepsinasen, und Ereptasen unterschieden, und DERNBY dies mit entsprechenden Abänderungen auch für die tierischen Gewebe übernommen. Indessen sind trotz des bisweilen auffallend sauren Optimums (bis zu 3,5) die Gewebsproteinasen keine echten Pepsinasen, wenn es auch Übergänge zu geben scheint, wie das „Pepsin" der *Drosera* (l. c. 50, 51). Man kann wohl annehmen, daß das echte Pepsin ein secundäres Anpassungsprodukt der höheren Tiere ist, entstanden aus dem Kathepsin der Schleimhaut des Verdauungsrohres. Im Magen gibt es ja noch ein zweites Sonderferment bei jungen Säugetieren, die **Chymase** (Labferment), die noch ziemlich geheimnisvoll ist. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Chymase nichts weiter ist als ein im Überschuß producirtes und abgegebenes Kathepsin, jedoch ist dies nicht sicher, vielleicht ist sie überhaupt keine Proteinase; zum mindesten ist eine hydrolytische

---

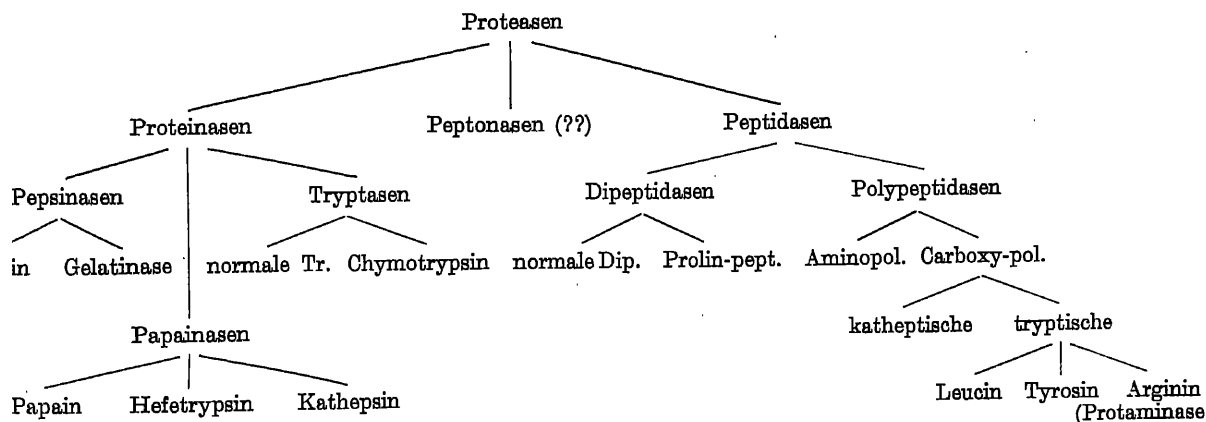
59) ***E. Waldschmidt-Leitz, Sh. Akabori***, Enz. Kompon. der Proteinase aus Pankr. Zs. phys. Chem., **228**, 224 (1934). S.A. — 60) ***R. Willstätter, E. Bamann***, Proteasen der Magenschleimhaut, Zs. phys. Chem., **180**, 127 (1928).

Bildung von Aminogruppen nicht sicher nachzuweisen (Holter 61)). Wir können hier darauf nicht eingehen und wollen die Chymase vorläufig zu den Kathepsinen rechnen.

Eine sehr sonderbare und noch nicht befriedigend klargestellte gemeinsame Eigenschaft aller Papainasen (Papain, Hefentrypsin, Kathepsin etc.) ist die, daß das Enzym als solches Peptone nicht angreift, wohl aber nach Aktivirung durch HCN oder Thiole, resp. die natürlichen „Kinasen". Definirte Polypeptide werden auch dann nicht gespalten. Es spricht dies dafür, daß das Ferment noch eine besondere Polypeptidase (oder Peptonase?) enthält, die eben aktivirt wird (vgl. S. 620). Es ist dies aber noch ebensowenig völlig klar, wie der Mechanismus der Aktivirung an sich. Vieles spricht dafür, daß das Agon dieser Enzyme selbst ein Thiosystem ist (vgl. 62)); darauf können wir erst im speciellen Teil zurückkommen. Hefeproteinase (Grassmann 63)) und Kathepsin sind im nicht aktiven Zustande überhaupt unwirksam, auch auf Proteine.

Zum Schluß ist eine Tabelle von Grassmann (l. c. 1, S. 187) verkürzt wiedergegeben, welche die Systematik der Proteasen umfaßt. Wiederholt sei, daß Pepsin nur genuine Proteine angreift. (+ = spaltbar, — = unspaltbar). Lit. für die Einzelangaben, soweit nicht hier angegeben, im speciellen Teil.

ENZYM	Genuine Proteine	Protamine	Peptone	Polypeptide	Dipeptide	Acylirte Peptide	Peptidester, -amide etc.	
Tryptase, aktivirt	+	+	+	—	—	—	—	
Papain	+	—	—	—	—	—	—	
do., aktivirt	+	+	+	—	—	—	—	
Hefenproteinase . . . . — } Kathepsin . . . . — }	+	+	+	—	—	—	—	Beide aktivirt, inaktiv unwirksam
Trypt. Carboxy-polyp. aktivirt (Enterokin.) . . .	—	+	+	+	—	+	—	
Kathept. Carboxy-polypept., aktivirt			+ (?)	+ (z.T.)	—	+	—	
Amino-polypeptidase . . .	—	—	+	+	—	—	+	
Dipeptidase	—	—		—	+	—	—	

Übersicht über die besser bekannten Proteasen.

61) ***H. Holter***, Labwirkung. Bioch. Zs., **255**, 160 (1932). — 62) ***Th. Bersin***, Thioverbind. und Enzyme. Erg. Enzymf. IV, 68. Leipzig 1935. — 63) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff***, Proteinase etc. der Hefe. Zs. phys. Chem., **179**, 41 (1928). S.A.

II. Einfachste Bausteine des Proteinmoleküls.

(Mitbearbeitet von Dr. W. ROMAN).

1) N-freie organische Spaltprodukte.

§ 461. Neuerdings sind einige N-freie Spaltprodukte bei der nicht fermentativen Spaltung festgestellt worden. Inwieweit es sich hierbei um wirkliche Bausteine des Eiweiß handelt, muß noch dahingestellt bleiben. An solchen N-freien Spaltprodukten sind bisher Acetaldehyd und Fumarsäure isolirt worden. Über den Kohlenhydratgehalt einzelner Proteine s. § 477.

Acetaldehyd tritt beim Erwärmen von Eiweißkörpern mit NaOH auf; er bildet sich nach RIESSER c.s. **63a)** jedoch nur aus genuinen Proteinen, aber aus keinem bekannten Spaltprodukt, auch nicht aus Serin oder seinem Phenylhydantoin, sodaß wohl die Art der Bindung der Bausteine im Eiweiß maßgebend für die Acetaldehydabspaltung ist. Für die direkte Bildung spricht auch, daß HOFFMEISTER **64)** sowohl bei der tryptischen Verdauung von Fibrin, Ovalbumin und Casein, als auch bei Quarzlampenbestrahlung von Eiweiß und Pepton Acetaldehyd nachweisen und auch als Aldomedon isoliren konnte.

Fumarsäure wurde in Form ihres Dimethylesters in der zwischen 100° und 130° übergehenden Fraktion bei der Hochvakuumdestillation eines mit CH_3OH veresterten Gelatinehydrolysats (hergestellt durch 16stündiges Kochen mit 25 %iger Schwefelsäure) von ABDERHALDEN u. HAAS **65)** nachgewiesen. Die gefundene Fumarsäure ist nicht secundär aus Asparaginsäure entstanden, da reine Asparaginsäure bei gleicher Behandlung keine Fumarsäure gab.

2) Ammoniak.

§ 462. Bei der Frage der Entstehung des NH_3 aus Proteinen müssen wir streng unterscheiden zwischen Versuchen, die mit reinen Eiweißkörpern und sozusagen reinen Fermenten gemacht sind, und den Autolyseversuchen. Alle Autolyseversuche sind für diese Frage an dieser Stelle nicht zu verwerten; denn das NH_3 kann aus den verschiedensten Quellen stammen: 1. vor allem aus Purinen (s. § 435), 2. aus dem provisorisch gespeicherten Glutamin (KREBS, § 443, l. c. 8), 3. aus der Desaminirung der Aminosäuren in der Niere (s. § 436). Auf die 4. noch nicht geklärte Möglichkeit, daß auch im Tierkörper secundär aus Arginin über Harnstoff NH_3 entsteht, sei hier nur hingewiesen (Näheres s. unter Urease § 453).

Hier interessiren somit nur solche Arbeiten, bei denen diese secundären Quellen mehr oder minder ausgeschlossen werden können. Die Hauptquellen des im Körper wirklich direkt aus Proteinen entstehenden NH_3 sind sicher A s p a r a g i n und G l u t a m i n (§ 443). So entsteht durch kombinirte Wirkung von Proteasen und Amidasen NH_3, worauf bereits im H.W. S. 813 hingewiesen wurde.

Der Gehalt an Amiden in p f l a n z l i c h e n Proteinen, besonders den Edestinen der Samen, ist bereits § 443 l. c. 12 mitgeteilt worden, s. a. § 468. Über die Bildung von NH_3 auch aus t i e r i s c h e n Proteinen liegen folgende neuere Untersuchungen vor:

Die NH_3-Bildung schreitet bei der tryptischen Hydrolyse noch fort, wenn die eigentliche Lösung der Peptidbindungen bereits zum Stillstand gekommen ist. So finden HUNTER u. SMITH **66)** folgende Mengen NH_3 und freie NH_2-Gruppen als % vom Gesamt-N:

63a) ***O. Riesser, A. Hansen, R. Nagel,*** Über die Bildung von Acetaldehyd bei der alkalischen Spaltung von Eiweißkörpern. Zs. phys. Chem., **196**, 201 (1931). — 64) ***A. Hoffmeister,*** Bildung von Acetaldehyd bei der pankreat. Verdau. und bei der Bestrahl. von Eiweißkörpern. Zs. phys. Chem., **205**, 183 (1932). — 65) ***E. Abderhalden, R. Haas,*** Zum Problem der Struktur der Proteine. Zs. phys. Chem., **151**, 114 (1926) Anhang S. 125. S.A. — 66) ***A. Hunter, R. G. Smith,*** Liber. of ammonia in tryptic dig. Jl. of Biol. Chem., **62**, 649 (1925).

Bei Verdauung von	nach 5 Tagen		nach 10 Tagen		nach 88 Tagen	
	% NH_2	% NH_3	% NH_2	% NH_3	% NH_2	% NH_3
Casein	42,2	2,22	43,7	2,65	42,8	4,26
Gliadin	25,3	3,61	—	—	—	—
Witte-Pepton	34,6	0,64	37,4	0,98	41,8*	2,30*

* Nach 68 Tagen.

Am 88. Tage sind bei Casein 61 % NH_3 mehr vorhanden als am 10. Tage. Weiteres hierzu s. bei Tryptase.

Als eine weitere Quelle der NH_3-Bildung kommen neben Glutamin und Asparagin die **Uraminosäuren** in Betracht (H.W. S. 813); über deren noch immer fragliches Vorkommen als Bausteine des Eiweißmoleküls s. § 476a.

3) Aminosäuren.

§ 463. Die wichtigste neue Tatsache ist die Feststellung, daß alle natürlichen Aminosäuren ihrer Konfiguration nach der l-Reihe angehören, wie bereits im H.W. S. 814 nach den Arbeiten von KARRER als wahrscheinlich angenommen und inzwischen von FREUDENBERG und anderen für alle Aminosäuren bestätigt wurde, s. hierzu ABDERHALDEN **67)**, sowie FREUDENBERG c.s. **68)**, GOLDSCHMIDT **69)**, KARRER **69a)**. Über Methoden zur Isolirung und Bestimmung von Aminosäuren s. ABDERHALDEN **67)**. Bestimmungsmethoden s. auch § 494.

Monoaminosäuren. Alanin. Gehalt in Seidenfibroin: 21,8 %, Zein: 8,9 %, Casein: 5,3 %, Keratin: 3,8 %, Gelatine: 2,5 % nach einer neuen Methode bestimmt von FÜRTH c.s. **70)**.

(+)-α-Aminobuttersäure ist aus der Sklera des Wal-Auges von OIKAWA **71)** nach Säurespaltung isolirt und damit endgültig als Eiweißbaustein nachgewiesen worden.

(+)-α-Amino-valeriansäure **(Nor-valin)** wurde von ABDERHALDEN **72)**, **73)** neben Valin ((+)-α-Amino-isovaleriansäure) und Leucin bei der Hydrolyse von Globin durch fraktionirte Krystallisation isolirt und durch die größere Aminirungsgeschwindigkeit nach vorhergehender Bromirung gegenüber der entsprechenden Iso-Verbindung identifizirt. ABDERHALDEN u. REICH **74)** isolirten die neue Aminosäure auch aus dem Casein, das mehr als 1 % Norvalin enthält. Auf die gleiche Weise konnte ABDERHALDEN **75)** das l(+)-Norvalin auch im Rinderhorn **76)**, Gehirneiweiß **75)**, Seidenleim **77)**, Seidenfibroin **78)** und im Darminhalt des Rindes **75)** nachweisen, sodaß es also als normales Abbauprodukt des Eiweißes bei der Hydrolyse angesehen werden kann **75)**.

67) ***E. Abderhalden***, Verbindungen mit offenem Stickstoff in: Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere, 2. Aufl. Erg.-Werk, Bd. I, Jena 1933, S. 151. — 68) ***K. Freudenberg, A. Noë***, Die Konfigur. der Asparaginsäure. Ber. Chem. Ges., **58**, 2399 (1925). — 69) ***St. Goldschmidt, G. Freyss***, Über die Konfigur. des natürlichen (—)-Tyrosins. Ber. Chem. Ges., **66**, 784 (1933). — 69a) ***P. Karrer, V. Itschner***, Konfig. d. Nor-leucins etc. Helv. Chim. Acta, **18**, 782 (1935). — 70) ***O. Fürth, R. Scholl, H. Herrmann***, Versuche über Eiweißabbau IV. Bioch. Zs., **251**, 404 (1932). — 71) ***Sh. Oikawa***, Über die Zusammens. von Sehne und Sklera. Japan. Jl. med. sci. II. Biochem., **1**, 61 (1925). — 72) ***E. Abderhalden, A. Bahn***, Nachweis von d-α-Aminovaleriansäure (Nor-valin) ... unter den Spaltprod. des Globins etc. Ber. Chem. Ges., **63**, 914 (1930). S.A. — 73) ***E. Abderhalden, K. Heyns***, Nachweis von Norvalin unter den Spaltprod. von Eiweißstoffen. Zs. phys. Chem., **209**, 27 (1932). S.A. — 74) ***E. Abderhalden, F. Reich***, d-α-Amino-norvaleriansäure (Nor-valin) als Baustein von Eiweißstoffen. Zs. phys. Chem., **193**, 198 (1930). S.A. — 75) ***E. Abderhalden***, l(+)-Norvalin, ein neuer Baustein von Proteinen. Verh. 14. internat. Kongr. Physiol., **3** (1932); Ber. ges. Phys., **72**, 600. — 76) ***E. Abderhalden, K. Heyns***, Über den Gehalt des Rinderhorns an Aminosäuren. Zs. phys. Chem., **206**, 137 (1932). S.A. — 77) ***E. Abderhalden, O. Zumstein***, Gehalt von Leim aus Seide von Bombyx mori. Zs. phys. Chem., **207**, 141 (1932). S.A. — 78) ***E. Abderhalden, K. Heyns***, Die bei der Hydrol. von Tussahseidenfibrin sich bild. Abbauprodukte. Zs. phys. Chem., **202**, 37 (1931). S.A.

(+)-Norleucin. Isolirung aus der frischen Rückenmarksubstanz der Rinder und Bestimmung seiner Krystallstruktur YAGINUMA 79); weitere Eigenschaften und Identität mit synthetischem Norleucin CZARNETZKY 80).

Oxyaminosäuren. Serinphosphorsäure $(OH)_2 . PO . OCH_2 . CH(NH_2) . COOH$, zuerst aus Casein isolirt; Näheres s. § 284 und § 477.

Oxyaminobuttersäure $C_3H_5(OH)NH_2COOH$ wurde von SCHRYVER 81) nach der Carbamatmethode aus dem Glutelin des Hafers isolirt; die Stellung der OH- und NH_2-Gruppe konnte von den Autoren aber noch nicht festgelegt werden. Das Produkt war in Folge der Herstellungsweise racemisirt. Als β-Oxy-α-aminobuttersäure wurde der „unbekannte wesentliche" wachstumsfördernde Faktor aus hydrolysirten Proteinen erkannt (82a)). RIMINGTON 83) sieht die Oxyaminobuttersäure als Baustein des von ihm aus Casein isolirten Phosphopeptons (s. § 477) an. Die von CZARNETZKY 86) aus Casein isolirte und gleichfalls als β-Oxy-α-aminobuttersäure angesprochene Verbindung war nach ABDERHALDEN 85) ein Leucin. Eine Oxyaminosäure $C_4H_{11}O_3N$ ist auch von GORTNER u. HOFFMAN 82) im Gliadin und Hordein aufgefunden worden, sowie im Teozein, einem Prolamin aus Samen von *Euchlaena mexicana Schad.*

Oxyaminovaleriansäure **(Oxyvalin)** $C_4H_7(OH)NH_2COOH$ wurde von SCHRYVER 81) aus dem Glutelin des Hafers auf die gleiche Weise wie Oxyaminobuttersäure neben dieser erhalten und auch von BRAZIER 84) aus Zein isolirt.

Die synthetische Darstellung von α-Amino-β-oxybuttersäure, α-Amino-β-oxyisovaleriansäure (Oxyvalin) und α-Amino-β-oxy-n-valeriansäure (Oxy-Norvalin) durch ABDERHALDEN 85) führte zu Stoffen, die in ihren Eigenschaften von den von SCHRYVER 81) beschriebenen Verbindungen so erheblich abweichen, daß diese natürlichen Spaltprodukte wohl eine andere (bisher unbekannte) Struktur besitzen 85).

Schwefelhaltige Aminosäuren. l-Cystin. FOLIN c.s. 87) fanden folgende Cystinmengen in verschiedenen Proteinen: Casein: 0,30 %; Gliadin: etwa 2,18 %; Edestin: 1,35 %; Zein: 1,03 %; Ovalbumin: 1,22 %; Serumalbumin: 6,04 %. Neu aufgefunden als Aminosäure die Djenkolsäure aus der Bohne *Pithecolobium lobatum*, Hinterindien. Besteht aus 2 Cystin, verbunden durch CH_2 (87a).

Methionin $C_5H_{11}O_2NS$. Die Auffindung dieser neuen S-haltigen Aminosäure durch MUELLER 88), der sie aus Casein und Ovalbumin und in geringer Menge auch aus Edestin, Wolle und Gelatine erhalten hatte, wurde bereits im H.W. S. 816 erwähnt. Sie wurde weiterhin von ODAKE 89) aus Hefe, von BARGER 90) und PIRIE 91) aus Caseinogen und von ABDERHALDEN

79) ***T. Yaginuma, G. Arai, K. Hayakawa,*** Physiko-chem. Unt. über Aminosäuren V. Proc. Imp. Acad. Tokyo, **8**, 91 (1932). — 80) ***E. J. Czarnetzky, C. L. A. Schmidt,*** The isol. of norleucine etc. Jl. of Biol. Chem., **97**, 333 (1932). — 81) ***S. B. Schryver, H. W. Buston,*** The isol. of some hitherto undescr. prod. of hydrol. of proteins II. Proc. Roy. Soc. London ***B.*** **99**, 476 (1926). — 82) ***R. A. Gortner, W. F. Hoffman,*** Evid. of a new amino acid in proteins. Jl. Am. chem. Soc., **47**, 580 (1925). — 82a) ***W. C. Rose c.s.,*** Isol. of the unknown essent. present in proteins. Jl. of Biol. Chem., **109**, LXXVII (1935). — 83) ***C. Rimington,*** The phosphorus of caseinogen II., Biochem. Jl., **21**, 1187 (1927). — 84) ***M. A. B. Brazier,*** A new method for the separ. of the prod. of protein hydrol. Biochem. Jl., **24**, 1188 (1930). — 85) ***E. Abderhalden, K. Heyns,*** Die Synthese von α-Amino-β-oxy-n-buttersäure etc. Ber. Chem. Ges., **67**, 530 (1934). S.A. — 86) ***E. J. Czarnetzky, C. L. A. Schmidt,*** Die scheinbaren Dissoziationskonst. gewisser Amino- und Oxyaminosäuren etc. Zs. phys. Chem., **204**, 129 (1932). — 87) ***O. Folin, A. D. Marenzi,*** An improved colorim. meth. for the determ. of cystine in proteins. Jl. of Biol. Chem., **83**, 103 (1929). — 87a) ***A. G. van Veen, A. J. Hyman,*** Djenkolsäure. Rec. Trav. chim., **54**, 493 (1935); BPh **89**, 15. — 88) ***J. H. Mueller,*** A new sulfur-containing amino-acid isol. from hydrolyt. prod. of proteins. Jl. of Biol. Chem., **56**, 157 (1923). — 89) ***S. Odake,*** Vorkommen einer schwefelhaltigen Aminosäure im alkohol. Extrakt der Hefe. Bioch. Zs., **161**, 446 (1925). — 90) ***G. Barger, F. Ph. Coyne,*** The amino-acid methionine, constitution and synthesis. Biochem. Jl., **22**, 1417 (1928). — 91) ***N. W. Pirie,*** Improved methods for the isol. of methionine and ergothioneine. Biochem. Jl., **27**, 202 (1933).

92) aus dem Keratin des Rinderhornes isolirt. DU VIGNEAUD c.s. 93) erhielten Methionin aus den Hydrolysaten von der tryptischen Verdauung des Caseins direkt nach Entfernung des Tyrosins: Methionin ist also kein secundäres Produkt 93). Konstitution nach BARGER 90): α-Amino-γ-methylthio-n-buttersäure: $CH_3S . CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$. Synthese BARGER 94) und WINDUS 95); Trennung des Racemats in die optischen Komponenten 96); die l-Verbindung entspricht dem natürlichen Produkt. Über das Tripeptid Glutathion s. bei den Polypeptiden (§ 469).

§ 465. **Diaminosäuren.** (+)-Lysin bildet nach GRASSMANN 97) ein schwer lösliches Reineckat der Zusammensetzung $C_6H_{14}O_2N_2 . 2\,Cr(NH_3)_2 . (CNS)_4H . 4\,H_2O$. d-l-Lysin wurde von SCHRYVER 98) bei der Säurehydrolyse der Gelatine erhalten; es soll nicht durch Racemisirung des d-Lysins entstanden sein, sondern aus einem noch unbekannten Bestandteil des Proteins, aus dem es nur durch Säureeinwirkung in der Kälte freigesetzt wird.

Oxylysin $C_6H_{14}O_3N_2$ wurde von SCHRYVER 102) aus Hausenblase nach der Carbamat-Methode isolirt. Die Substanz hat wahrscheinlich die Konstitution $CH_2NH_2 . CH_2 . CH_2 . CHOH . CHNH_2 . COOH$, ist also eine α, ε-Diamino-β-hydroxy-n-hexansäure. Die Hausenblase von Stör (*Acipenser*) enthält 2,98 bis 3,3 % Oxylysin-N (% vom Gesamt-Protein-N), Fischgelatine: 1,8 bis 2,2 %, Edestin aus Hanfsamen: 3,28 %, Albumin aus Kohl: 1,55 %, alkalilösliches Haferprotein: 1,50 %, während die Autoren in von Säugetieren stammender Gelatine weniger als 0,3 %, in Pferdeblut-Fibrin nur Spuren und in Ovalbumin und Milchcasein gar kein Oxylysin finden konnten.

(+)-**Arginin** wird bei der tryptischen Verdauung sowohl wie bei der Säurehydrolyse nur zu etwa $^2/_3$ aus den Eiweißstoffen freigesetzt, während etwa ein Drittel des Arginins in den meisten Proteinen trypsinfest ist (HUNTER u. DAUPHINEE 99), 100)). Während Arginin aus einigen Proteinen (Caseinogen, Gelatine) durch das Trypsin sehr rasch frei gemacht, und bereits in drei Stunden die gesamte durch Trypsin abspaltbare Menge gefunden wird, beobachteten DAUPHINEE u. HUNTER 100) bei Edestin, Fibrin, Witte-Pepton und besonders Ovalbumin einen langsamen Anstieg der Argininmenge während der Verdauung, die aber bei allen Eiweißstoffen annähernd zu dem gleichen Grenzwert führte. Dieser Wert lag bei Säurespaltung etwas höher, jedoch ist bei dieser die Geschwindigkeit noch geringer als bei der tryptischen Verdauung der letztgenannten Proteine, und die Hydrolyse durch Säure verläuft auch bei allen (untersuchten) Proteinen langsam. Weiteres § 478a Abspaltung eines endständigen Arginins aus Protaminen durch Protaminase s. WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 35). Methode zur Reindarstellung von Arginin s. 101). Bestimmung von Arginin s. WEBER 101a) und § 438.

Citrullin (δ-Carbamido-ornithin) mit der Struktur $H_2N . CO . NH . CH_2CH_2CH_2CH . (NH_2)COOH$, wurde von WADA 106) aus der Wassermelone *Citrullus* zuerst isolirt; Struktur auch von diesem durch Synthese bestätigt. Die Säure wurde bei der tryptischen Verdauung

92) ***E. Abderhalden, K. Heyns***, Nachweis von Methionin im Keratin des Rinderhorns. Zs. phys. Chem., **207**, 191 (1932). S.A. — 93) ***V. Du Vigneaud, C. Meyer***, Isol. of methionine by enzymatic hydrolysis. Jl. of Biol. Chem., **94**, 641 (1932). — 94) ***G. Barger, Th. E. Weichselbaum***, A new synthesis of methionine. Biochem. Jl., **25**, 997 (1931). — 95) ***W. Windus, C. S. Marvel***, A synthesis of menthionine. Jl. Am. chem. Soc., **52**, 2575 (1930). — 96) ***W. Windus, C. S. Marvel***, The resolution of synth. methionine. Jl. Am. chem. Soc., **53**, 3490 (1931). — 97) ***W. Grassmann, O. Lang***, Lysin-reineckat. Bioch. Zs., **269**, 233 (1934). S.A. — 98) ***S. B. Schryver, H. W. Buston***, The isol. of some hitherto undescribed prod. of hydrol. of proteins IV., Proc. Roy. Soc. London B, **101**, 519 (1927). — 99) ***A. Hunter, J. A. Dauphinee***, Determ. of arginine by the use of arginase etc. Jl. of Biol. Chem., **68**, Nr. 1, S. XXXIX (1925). — 100) ***J. A. Dauphinee, A. Hunter***, The rate of liber. of arginine in tryptic dig. Biochem. Jl., **24**, 1128 (1930). — 101) ***H. B. Vickery, Ch. S. Leavenworth***, Prep. of arginine. Jl. of Biol. Chem., **75**, 115 (1927). — 101a) ***C. J. Weber***, A Mod. of Sakaguchi's reaction for the quant. determ. of arginine. Jl. of Biol. Chem., **86**, 217 (1930). — 102) ***S. B. Schryver, H. W. Buston***, The isol. of a prod. of hydrol. of the proteins hitherto undescribed. Proc. Roy. Soc. London **B**, **98**, Nr. B 687, S. 58 (1925).

von Casein bei neutraler Reaktion von WADA 107) erhalten. Bei alkalischer Reaktion entsteht an Stelle des Citrullins Ornithin, während sich das Citrullin bei Säurespaltung oder nachträglicher Einwirkung von Säure secundär in Prolin umwandelt. Ein Teil des bei der Hydrolyse von Eiweiß gefundenen Prolins könnte diesen Ursprung haben. Aus Arginin entsteht bei Einwirkung von Trypsin kein Citrullin (107) (S. 570). — Über angeblichen dehydrirenden Abbau von Citrullin und ähnlichen Stoffen zu Harnstoff s. WADA **107a**); Näheres bei Dehydrasen.

Canalin $C_4H_{10}O_3N_2$ entsteht durch Spaltung des Guanidinkörpers Canavanin mit dem Enzym Canavanase (S. 574), (KITAGAWA c.s. **103**), **105**)). Die von KITAGAWA **105**) angenommene Struktur einer α, γ-Diamino-γ-oxybuttersäure $NH_2 . O . CH_2 . CH_2 . CH(NH_2)COOH$ wurde von GULLAND u. MORRIS **104**) bestätigt.

Diaminodicarbonsäuren. Eine Dodecandiaminodicarbonsäure $C_{10}H_{18}(NH_2)_2(COOH)_2$ wurde von FRÄNKEL **108**) durch Verdauung mit Pankreatin aus Casein gewonnen. Sie ist optisch inaktiv, enthält ein Mol. Krystallwasser, das sie bei 125° bis 130° verliert. Die wasserfreie Substanz schmilzt bei 261,5°.

4) Aromatische Spaltungsprodukte.

§ **466**. Tyrosin wird nach FÜRTH c.s. **109**) sowohl durch Trypsin als auch durch Alkali aus den meisten Proteinen rascher abgespalten als die anderen Aminosäuren, sodaß sie dem Tyrosin eine gewissermaßen periphere Stellung im Eiweißmolekül zuerkennen wollen. FOLIN c.s. **110**) fanden folgende Tyrosinmengen in verschiedenen Proteinen: Ovalbumin: 3,98 %; Serumalbumin: 3,66 %; Muskelglobulin: 3,92 %; Gliadin: etwa 3,1 %; Edestin: etwa 4,4 %; Hämoglobin: 3,15 %; Zein: 5,88 %; s. a. McFARLANE, FULMER **111**).

(+)-3,5-Dijodtyrosin wurde von HARINGTON c.s. **112**) **113**) und FOSTER **114**) aus dem Jodthyreoglobulin der Schilddrüse nach enzymatischer Spaltung des Globulins mit Pepsin oder Trypsin aus den erhaltenen Hydrolysaten isolirt.

5) Heterocyclische Spaltprodukte.

§ **467**. Prolin, Oxyprolin. Abscheidung und Charakterisirung als Reineckat s. KAPFHAMMER c.s. **115**). Secundäre Bildung von Prolin aus Citrullin s. WADA **107**). Farbreaktionen des Prolins und Oxyprolins mit Ninhydrin, Isatin und anderen Farbstoffen s. GRASS-

---

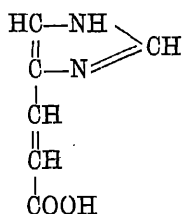
103) ***M. Kitagawa, T. Tomiyama,*** A new aminocompound in the Jack bean and a corresponding new ferment I. Jl. of Biochem., **11**, 265 (1929); ***M. Kitagawa, H. Yamada,*** Studies on a diamino acid, canavanin (II). Jl. of Biochem., **16**, 339 (1932). — 104) ***J. M. Gulland, C. J. O. R. Morris,*** Canavanine. Jl. of chem. Soc. **1935**, 763. — 105) ***M. Kitagawa, Sh. Monobe,*** The const. of canalin. Jl. of Biochem., **18**, 333 (1933). — 106) ***M. Wada,*** Citrullin, eine neue Aminosäure im Preßsaft der Wassermelone Citrullus vulgaris Schrad. Bioch. Zs., **224**, 420 (1930). — 107) ***M. Wada,*** Isol. of citrullin from the tryptic dig. products of casein. Proc. Imp. Acad. Tokyo, **8**, 367 (1932); Bioch. Zs., **257**, 1 (1933). — 107a) ***M. Wada,*** Über die Bildg. des Harnstoffs aus Uraminosäuren etc. Proc. Imp. Acad. Tokyo, **10**, 17 (1934); BPh **79**, 195. — 108) ***S. Fränkel, M. Friedmann,*** Über eine neue Dodecandiaminodicarbonsäure aus Casein. Bioch. Zs., **182**, 434 (1927). — 109) ***O. Fürth, A. Fischer,*** Ermittlung des Tyrosingehalts von Proteinen. Bioch. Zs., **154**, 1 (1924). — 110) ***O. Folin, A. D. Marenzi,*** Tyrosine and tryptophane determ. in one-tenth gram of protein. Jl. of Biol. Chem., **83**, 89 (1929). — 111) ***W. D. McFarlane, H. L. Fulmer,*** The color. determ. of the tyrosin and tryptophan content of various crude protein concentrates. Biochem. Jl., **24**, 1601 (1930). — 112) ***Ch. R. Harington, S. St. Randall,*** Jodine-containing compounds of the thyroid gland. Biochem. Jl., **23**, 373 (1929); The isolation of d-3:5-dijodotyrosine from the thyroid gland by the action of proteol. enz. Biochem. Jl., **25**, 1032 (1931). — 113) ***Ch. R. Harington, W. Th. Salter,*** The isol. of l-thyroxine from the thyroid gland by the action of prot. enz. Biochem. Jl., **24**, 456 (1930). — 114) ***G. L. Foster,*** The isol. of 3,5-Diiodotyrosine from the thyroid. Jl. of Biol. Chem., **83**, 345 (1929). — 115) ***J. Kapfhammer, R. Eck,*** l-Oxyprolin und l-Prolin, Darstellung aus Eiweiß mit Hilfe des Reineckats. Zs. phys. Chem., **170**, 294 (1927).

MANN 116). Oxyprolin als neuer Baustein des Clupeins FELIX **116a)**. α-Oxypyrrolidin-α-carbonsäure kommt vielleicht gleichfalls als Eiweißbaustein vor **(117)**; Bildung aus Glutaminsäure ABDERHALDEN **117)**.

(—) Histidin. Methoden zur Reindarstellung s. VICKERY 118) und ABDERHALDEN **119)**. Abscheidung und Charakterisirung als Reineckat s. KAPFHAMMER c.s. **119a)**.

Protoctin mit der empirischen Formel $C_8H_{15}O_3N_3$ wurde von SCHRYVER u. BUSTON **120)** aus dem Haferglutelin und dem Eiweiß des Samens von *Ricinus* isolirt. Die Konstitution ist noch nicht aufgeklärt. Das Molekül enthält eine Amino-, eine Carboxyl- und eine Hydroxylgruppe; die beiden anderen N haben gleichfalls basische Funktionen, bilden aber vielleicht, ähnlich wie beim Histidin, einen Imidazol-Ring.

```
HC—NH\
||     >CH
C—N//
|
CH
||
CH
|
COOH
```

Urocaninsäure, die bereits von HUNTER **121)** bei pankreatischer Verdauung von Casein isolirt worden war, wurde neuerdings von ABDERHALDEN c.s. **122)** bei der tryptischen Verdauung von Edestin erhalten. Obwohl möglichst steril gearbeitet wurde, ist eine secundäre Bildung aus Histidin nicht ausgeschlossen. Diese Bildung aus Histidin würde eine Analogie zur Aspartase-Reaktion (s. § 443) beim Eiweißabbau darstellen.

(—)-Tryptophan. Bei der tryptischen Hydrolyse werden in einer Stunde aus Casein $^3/_4$, aus Edestin weniger als die Hälfte und aus Globulin (aus dem Samen einer Cucurbitaceenart) $^2/_5$ des gesamten Tryptophans in Freiheit gesetzt **(123)**. Im Witte-Pepton ist von vornherein ein Drittel des Tryptophans frei, durch Trypsin wird in einer Stunde ein weiteres Drittel abgespalten. Die Abspaltung erfolgt leichter und rascher aus Casein als aus den beiden anderen Proteinen **(124)**. RAGINS **123)** bestimmte auch die Gleichgewichts-Bedingungen zwischen gebundenem und freiem Tryptophan bei Einwirkung von Trypsin und Trypsin + Pepsin. Pepsin allein scheidet kein Tryptophan ab; Erepsin (nach Trypsin angewandt) erhöht die Menge des freien Tryptophans gleichfalls nicht **(124)**. Im Seidenleim von *Bombyx mori* wurde Tryptophan von ABDERHALDEN (l. c. 77) in geringer Menge nachgewiesen. FOLIN c.s. **110)** fanden folgende Tryptophanmengen in verschiedenen Proteinen: Ovalbumin: etwa 1,20 %; Serumalbumin: 0,52 %; Muskel-Globulin: etwa 1 %; Gliadin: etwa 0,8 %; Edestin: etwa 1,50 %; Hämoglobin: 1,28 %; Zein: 0,20 %. RAGINS **125)** fand etwas niedrigere Werte für Gliadin und Edestin und außerdem im Casein: 1,23 %; Witte-Pepton: 2,97 % und in verschiedenen Pflanzenproteinen: 0,13 bis 1,67 %; weitere Bestimmungen s. MCFARLANE **111)**.

Ältere Versuche über die Isolirung von **Dioxypyrrolalanin** aus Gelatine sind von EMERSON **126)** nicht bestätigt worden.

6) Säureamide.

§ 468. Wie bereits im H.W. S. 813 mitgeteilt, ist es wahrscheinlich, daß die Aminodicarbonsäuren in den Proteinen z. T. in Form ihrer Amide enthalten sind. Von diesen werden Asparagin und Glutamin seit langem als normale Bestandteile des Pflanzeneiweißes angenommen.

116) ***W. Grassmann, K. v. Arnim,*** Über die Reaktion des Ninhydrins und Isatins mit Prolin und Oxyprolin. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **509**, 288 (1934); Neue Farbreaktionen des Pyrrolidins und Prolins. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **519**, 192 (1935). S.A. — 116a) ***K. Felix c.s.***, Clupein. Zs. phys. Chem., **211**, 187 (1932). — 117) ***E. Abderhalden, E. Schwab,*** Über die Bildung von α-Oxypyrrolidin-α-carbonsäure aus Glutaminsäure etc. Zs. phys. Chem., **158**, 88 (1926). — 118) ***H. B. Vickery, Ch. S. Leavenworth,*** The preparation of histidine. Jl. of Biol. Chem., **78**, 627 (1928). — 119) ***E. Abderhalden c.s.***, Versuche mit Histidin als Baustein enthaltenden Polypeptiden. Fermentforsch., **10**, 446 (1929). S.A. — 119a) ***J. Kapfhammer, H. Spörer,*** Eine neue Darstellung des l-Histidins aus Eiweiß. Zs. phys. Chem., **173**, 245 (1928). — 120) ***S. B. Schryver, H. W. Buston,*** The isol. of some hitherto undescr. products of hydrolysis of proteins III. Proc. Roy. Soc. London **B**, **100**, 360 (1926). — 121) ***A. Hunter***, On Urocanic acid. Jl. of Biol. Chem., **11**, 537 (1912). — 122) ***E. Abderhalden c.s.***, Bild. von Urocaninsäure bei der trypt. Verdauung von Edestin, Zs. phys. Chem., **182**, 201 (1929). S.A. — 123) ***J. Kraus-Ragins,*** Rate of liber. of tryptophane from proteins by enz. Proc. Soc. exp. Biol., **25**, 449 (1926). — 124) ***Dies.***, The rate with which tryptophane is liber. from proteins by enz. Jl. of Biol. Chem., **80**, 551 (1928). — 125) ***Dies.***, Determination of tryptophane in proteins. Jl. of Biol. Chem., **80**, 543 (1928). — 126) ***O. H. Emerson, C. L. A. Schmidt,*** Attempts to isol. dihydroxy-pyrrol-alanine from gelatin hydrolysates. Proc. Soc. exp. Biol., **32**, 291 (1934); BPh **87**, 23.

Neuerdings hat nun DAMODARAN 127) nach enzymatischer Spaltung durch aufeinander folgende energische Einwirkung von Pepsin (90 Stunden), Trypsin (4 Tage) und Hefe-Dipeptidase (4 Tage) auf Edestin krystallisirtes **Asparagin** erhalten, während er die Anwesenheit von Glutamin in den Hydrolysaten auf analytischem Wege nachweisen konnte. Die Isolirung von **Glutamin** gelang DAMODARAN c.s. 128) auf analoge Weise aus dem sehr viel glutaminsäurereicheren Gliadin. Auch ein Polypeptid mit Glutamin ist aus Gliadin isolirt worden (NAKASHIMA l. c. 141). Auf die secundäre Bildung von Glutamin als Ammoniakspeicher im Tierkörper ist § 443 hingewiesen worden. Die Frage des Vorkommens von **Uraminosäuren** in den Proteinen ist nach wie vor ungeklärt, vgl. die Erörterung zwischen BRIGL (l. c. 8) und GOLDSCHMIDT (l. c. 9). Wir kommen darauf bei den Strukturfragen (§ 476a) zurück.

III. Die Grundkörper des Proteinmoleküls *).

1) Polypeptide.

§ 469. Die Polypeptide haben für die enzymtypische Erforschung des Eiweißabbaus eine doppelte Bedeutung. Erstens sind sie heute mehr als je als die wahren Grundkörper des Proteinmoleküls anerkannt; dagegen tritt die Frage nach sonstigen Strukturverknüpfungen zwischen den Polypeptidketten oder besonderen Bildungen an den Kettenenden (Anhydride) vorerst noch in den Hintergrund. Da es andererseits bisher völlig unbekannt ist, wie die natürlichen Polypeptidketten in den komplicirteren Proteinen aussehen, ob immer nur wenige Glieder sich regelmäßig wiederholen, oder ob in jeder Kette zahlreiche Aminosäuren gebunden sind, so ist jedes Polypeptid von Interesse, das sich beim Abbau von Proteinen fassen läßt, wobei es hier gänzlich gleichgültig ist, ob es sich um einen rein chemischen oder enzymatischen Abbau handelt. Wir werden also hier wieder die neueren Angaben über beim Abbau isolirte Polypeptide bringen.

Zweitens aber hat auch die chemisch-synthetische Darstellung der Polypeptide ein großes enzymologisches Interesse, da an den verschiedensten synthetischen Polypeptiden mit mannigfachster Abwandlung der Struktur die Gesetze der Specifität der Peptidasen erforscht werden müssen, ein Gebiet, das wieder die Vorarbeit leisten muß für das Postulat der Zukunft, die Specifität der Proteinasen zu erhellen.

Von allen Fortschritten auf dem Gebiet der Polypeptid-Synthese ist der bedeutungsvollste die Ausarbeitung einer grundsätzlich neuen Methode durch M. BERGMANN c.s. 129). Sie ermöglicht ganz allgemein, optisch-aktive P. aufzubauen, und zwar auch aus solchen Aminosäuren, die man früher überhaupt nicht kuppeln konnte. Dies bezieht sich besonders auf die Peptide der zweibasischen Aminosäuren, sowie des Lysins und Prolins. Der Weg geht über die Carbobenzoxy-derivate, indem man etwa Glycin mit dem Chlorid der Benzyl-ester-kohlensäure $C_6H_5{\cdot}CH_2{\cdot}O{\cdot}CO{\cdot}Cl$ kuppelt. Das erhaltene Carbo-benzoxy-glycin $C_6H_5{\cdot}CH_2{\cdot}O{\cdot}CO\text{-}NH{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$ wird dann über das Chlorid mit weiteren Aminosäuren gekuppelt, also etwa zum Carbobenzoxy-glycyl-glycin $C_6H_5{\cdot}CH_2{\cdot}O{\cdot}CO\text{-}NH{\cdot}CH_2{\cdot}CO\text{-}NH{\cdot}CH_2{\cdot}COOH$. Dann wird durch katalytische Hydrirung die Carbobenzoxy-gruppe abgespalten, das Peptid freigesetzt. Arginin-peptide lassen sich nach diesem Verfahren herstellen, wenn man die basische Guanido-

*) Zusammenfassende neuere Darstellung s. ABDERHALDEN 128).

127) ***M. Damodaran***, The isol. of asparagine from an enzymic digest. of edestin. Biochem. Jl., **26**, 235 (1932). — 128) ***M. Damodaran, G. Jaaback, A. Ch. Chibnall***, The isol. of glutamine from an enzymic digest. of gliadin. Biochem. Jl., **26**, 1704 (1932). — 128) ***E. Abderhalden***, Struktur und Abbau der Proteine. Hb. der Bioch. Erg. Werk, Bd. I, 339, Jena 1933. — 129) ***M. Bergmann, L. Zervas c.s.***, Allg. Verfahren der Peptid-Synthese etc. Ber. Chem. Ges. **65**, 1192, 1692 (1932). S.A.; Zs. phys. Chem. **212**, 72 (1932), **224**, 26, 39 (1934). S.A.

gruppe durch Nitrirung abdeckt; die NO_2-Gruppe ist nachher leicht wieder (durch katalyt. Hydrirung) zu entfernen.

Über die Azido-fettsäuren gelangt FREUDENBERG **130)** zu Peptiden, z.B. aus Azidopropionsäure + Glycin zu Alanyl-glycin. — Synthese von ungesättigten Peptiden aus Aminoacrylsäure resp. Dehydro-phenylalanin BERGMANN **131)** (durch Peptidasen z.T. spaltbar).

Röntgendiagramme von Polyglycinen vom Dipeptid bis zu einem hochmolekularen Polyglycin mit 34 Gliedern (Molg. 2000) (hergestellt aus dem cyclischen Glycincarbonat) K. H. MEYER **132)**; zickzackförmige Ketten, liegen flach in Netzebenen vom Abstand 4,15 Å, ähnlich wie bei Seide und gestreckten Keratinen.

Als grundsätzlich wichtig für die Strukturaufklärung, nämlich die Reihenfolge der Aminosäuren in höheren Peptiden, sei noch der Abbau mit Hypobromit nach GOLDSCHMIDT **133)** angeführt, den er auch auf Proteine angewendet hat, worauf wir § 476a zurückkommen. Das Br setzt an der freien Aminogruppe an, aber in verschiedener Art. Die typische Peptidbindung wird nicht angegriffen, wohl aber die von Dioxopiperazinen. Festlegung der freien Carboxylgruppe als Benzamid, der freien Aminogruppe als Hydantoin (mit Phenylisocyanat) ABDERHALDEN **133a)**. Positionsbestimmung von Glycin durch Orthophtaldialdehyd ABDERHALDEN **134)**. Nachweis endständiger Glycin-gruppen als schwerlösliches Glycin-betain-HCl durch Methylirung ZIMMERMANN **134a)**.

Isolirung von Polypeptiden beim Eiweißabbau (ältere Befunde H. W. S. 822; die optische Bezeichnung ist hier weggelassen, da es sich natürlich stets um die P. aus der natürlichen Aminosäure handelt).

Leucyl-glutaminsäure aus Casein **(135)**;
Alanyl-tyrosin aus Tussah-Seide **(136)**;
Tyrosyl-prolin aus Casein (nicht absolut sicher) **(137)**;
Arginyl-arginin aus Clupein (KOSSEL **137a)**);
Glutaminyl-serin-phosphorsäure aus Casein (G. SCHMIDT **138)**, LEVENE **139)**).
Lysyl-prolyl-glycin aus Glutokyrin (GRASSMANN, l. c. 185);
Di-alanyl-alanyl-glycin aus Tussah-Seide **(136)**;
Seryl-prolyl-tyrosyl-prolin } aus Seidenfibroin **(140)**.
Tyrosyl-seryl-prolyl-tyrosin }

Tetrapeptid aus Gliadin durch Pepsinverdauung, unspaltbar durch alle Enzyme, enthaltend 1 Tyrosin, 1 Glutaminsäure, 2 Glutamin NAKASHIMA **141)**; er hält es für Tyrosyl-diglutamin-glutaminsäure, geht durch Desamidirung in Tyrosyl-diglutaminyl-glutaminsäure über; dieses Polypeptid ist durch Erepsin und Papain-HCl spaltbar. Tetrapeptid aus 4 Serinen aus Caseinogen POSTERNAK (l.c. 187).
Glycyl-seryl-prolyl-tyrosyl-prolin aus Seidenfibroin **140)**.

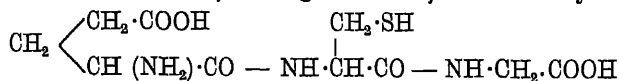
---

130) ***K. Freudenberg c.s.***, Synth. von Abkömml. der Aminosäuren. Ber. Chem. Ges. **65**, 1183 (1932). — 131) ***M. Bergmann c.s.***, Synth. eines Peptids der α-Aminoacryls. Zs. phys. Chem., **187**, 187, 196, 264 (1930). S.A. — 132) ***K. H. Meyer, Y. Go***, Obs. röntg. sur les polypept. Helv. Chim. Acta, **17**, 1488 (1934) (Lit.). — 133) ***St. Goldschmidt c.s.***, Abbau von Proteinen mit Hypobromit. Ber. Chem. Ges., **58**, 1346 (1925); Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **456**, 1; Zs. phys. Chem., **170**, 183 (1927); Ber. Chem. Ges., **63**, 1218 (1930); Zs. phys. Chem. **189**, 193 (1930). — 133a) ***E. Abderhalden, H. Brockmann***, Konstitut.-Ermittl. von Proteinen bezw. Polypept. Bioch. Zs., **225**, 386 (1930). S.A. — 134) ***E. Abderhalden, A. Neumann***, Verw. des Orthophtaldiald. zum Nachweis von Glykokoll etc. Zs. phys. Chem., **238**, 177 (1935). S.A. — 134a) ***W. Zimmermann c.s.***, Nachw. der freien Aminogruppe endständigen Glykokolls. Zs. phys. Chem., **231**, 19, 25, (1935). — 135) ***E. Abderhalden, W. Kröner***, Struktur der Proteine. Zs. phys. Chem., **178**, 276 (289) (1928). S.A. — 136) ***E. Abderhalden, K. Heyns***, Hydrol. von Tussah-Seiden-Fibrin etc. Zs. phys. Chem., **202**, 37 (1931). S.A. — 137) ***E. Abderhalden, H. Sickel***, Structur der aus Casein erhalt. Verb. (Tyrosyl-prolin). Zs. phys. Chem., **153**, 16, **158**, 139 (1926). — 137a) ***A. Kossel, W. Staudt***, Argininpeptid aus Clupein. ibid. **170**, 91 (1927). — 138) ***G. Schmidt***, Phosphorsäurehalt. Baustein des Caseinmol. Int. Phys. Kongr. 1932. BPh **71**, 658; Zs. phys. Chem., **223**, 86 (1934). — 139) ***P. A. Levene, D. W. Hill***, Dipeptide phosph. acid isol. from casein. Jl. of Biol. Chem., **101**, 711 (1933). — 140) ***E. Abderhalden, A. Bahn***, Isolirung von Glycyl-seryl-prolyl-tyrosin etc. Zs. phys. Chem., **210**, 246 (1932), **219**, 72 (1933). S.A. — 141) ***R. Nakashima***, Tetrapeptid aus Gliadin. Jl. of Bioch., **6**, 55, **7**, 441 (1926/7). S.A.

Aus Clupein hat FELIX beim Abbau mit Trypsin eine Reihe von strukturell noch nicht völlig geklärten Di — bis Tetrapeptiden isolirt, auf die wir § 477 zurückkommen. Auf die von FODOR 142) bei der Behandlung von Proteinen mit Glycerol oder Essigsäure-anhydrid erhaltenen höheren Polypeptidkomplexe, resp. Associate, die z.T. als Anhydride auftreten, kann hier nur verwiesen werden, da eine exaktere Strukturbestimmung fehlt. Er bezeichnet die einfacheren den Associaten zu Grunde liegenden Peptide, z. B. Tetrapeptide, als Acropeptide. Analoge Strukturen sieht er in den Pepsinpeptonen (§ 475).

Glutathion. Entdeckungsgeschichte und erste unrichtige Strukturangaben s. H.W. S. 1272. Auf die vielfache biologische Bedeutung dieses in allen Zellen vorkommenden reversiblen Redox-Systems gehen wir hier natürlich nicht ein.

Glutathion wurde von HOPKINS **143)** im Gegensatz zu seiner ersten Ansicht als Tripeptid erkannt, das neben Glutaminsäure und Cystin noch Glycin enthält. Durch KENDALL **144)**, GRASSMANN **145)**, ABDERHALDEN **146)** sichergestellt als γ-Glutaminyl-cysteinyl-glycin,

$$CH_2 \left\langle \begin{array}{l} CH_2 \cdot COOH \\ CH\,(NH_2) \cdot CO - NH \cdot \underset{}{\overset{CH_2 \cdot SH}{\overset{|}{C}H}} \cdot CO - NH \cdot CH_2 \cdot COOH \end{array} \right.$$

ZIMMERMANN (l. c. 134a) fand wieder kein endständiges Glycin. Darmerepsin spaltet nach KENDALL total; nach GRASSMANN ist es resistent gegen Proteinasen und Aminopolypeptidasen. Nur Carboxy-peptidase spaltet partiell in Glycin + Glutaminylcystin. Auch ABDERHALDEN fand Resistenz gegen Erepsin für Glutathion und eine Reihe von Derivaten. Synthese nach der BERGMANN'schen Methode HARINGTON **147)**.

2) Anhydride.

§ 471. Die Frage, ob außer reinen Peptidbindungen noch andere Strukturen im Proteinmolekül präformirt sind, ist in keiner Weise geklärt. In erster Linie handelt es sich um einfache Anhydridbildungen aus Peptiden, die Dioxopiperazine, deren natürliche Existenz ABDERHALDEN seit langen Jahren vertritt. Es sind indessen auch noch andere Ringbildungen angenommen worden; diese Annahmen sind z. T. rein hypothetisch, weil die ihnen zukommenden Strukturen überhaupt bisher im Abbau nicht aufgefunden wurden, teils unwahrscheinlich, weil die isolirten Stoffe als secundäre Gebilde anzusehen sind. Daß dies bei den einfachen Dioxopiperazinen auch so ist, dafür spricht die leichte Bildung dieser Körper durch Anhydrisirung; vor Allem aber die Tatsache, daß sie trotz ihrer relativ leichten Aufspaltbarkeit durch rein chemische Einflüsse anscheinend völlig resistent gegen sämtliche Teilenzyme des Eiweißabbaus sind. Das einzige, was sicher feststeht, ist die Tatsache, daß in keinem Falle irgendwelche Anhydridbildungen die Hauptstruktur der üblichen Proteine ausmachen, wie dies einige Forscher annahmen (vgl. § 474), und wie es für die Dioxopiperazine insbesondere SHIBATA **148/9)** in Anlehnung an die Theorie der „kleinen Grundkörper" vertreten hat, sowie noch neuerdings auf grund kinetischer Messungen der Hydrolyse ENSELME **150)**. Wenn überhaupt Anhydride oder sonstige Ringe natürlich vorhanden

142) ***A. Fodor, Ch. Epstein (S. Kuk)***, Abbau der Gelatine etc. mit Essigs.-anhydrid (Glycerin). Bioch. Zs. **200**, 211 (1928), **210**, 24, **214**, 242 (1929), **222**, 226, **228**, 315 (1930), **240**, 123, 140 (1931), **245**, 350 (1932), **259**, 331, **262**, 69 (1933). — 143) ***F. G. Hopkins***, Glutathione; Reinvestigation. Jl. of Biol. Chem., **84**, 269 (1929). — 144) ***E. C. Kendall c.s.***, Glutathione. Jl. of Biol. Chem., **84**, 657, **87**, 50, **88**, 409 (1929/31). — 145) ***W. Grassmann, H. Dyckerhoff, H. Eibeler***, Enz. Spalt. des Glutathions. Zs. phys. Chem., **189**, 111 (1930). S.A. — 146) ***E. Abderhalden, W. Geidel***, Struktur des Glutathions. Fermentforsch., **13**, 97 (1931). S.A. — 147) ***Ch. R. Harington, Th. H. Mead***, Synth. of glutathione. Biochem. Jl., **29**, 1602 (1935); BPh **91**, 253. — 148) ***K. Shibata***, Depolymer. von Proteinstoffen etc. Acta Phytoch., **2**, 39 (1925). S.A. — 149) ***K. Shibata***, A new concept. of the const. of proteins. Acta Phytoch., **2**, 193 (1926); BPh **43**, 19. — 150) ***J. Enselme c.s.***, Const. des protides. Bull. Soc. Chim. Biol., **12**, 357 (1930).

sind, so können sie an den Enden der langen Peptidketten vorkommen oder auch Peptidketten mit einander verbinden; das wäre an sich wichtig genug, um Proteine und höhere Peptone von reinen Peptidketten zu unterscheiden; aber sichergestellt ist das eben nicht. Auf die vielleicht andere Sachlage bei Skleroproteinen, besonders Seidenfibroin kommen wir §§ 476/7 zurück. Es muß übrigens ausdrücklich betont werden, daß auch ABDERHALDEN selbst (l. c. 130, S. 340) nicht mehr der Ansicht ist, daß diese einfachsten Anhydride eine quantitativ bedeutsame Rolle spielen. Bei der völligen Unklarheit der Grundfragen wollen wir uns damit begnügen, in größter Kürze das neue Material zu geben. Präparative Trennung von Anhydriden und offenen Ketten durch Jontophorese **150a)**.

a) Dioxopiperazine.

§ **472**. Folgende Dioxopiperazine wurden seither neu aus Proteinen isolirt (ABDERHALDEN **151/2)**).

Alanyl-glycinanhydrid aus Hundehaaren }
Alanyl-leucinanhydrid aus Schweinsborsten } durch Autoclaviren mit HCl,
Leucyl-glutaminsäureanhydrid aus Gliadin, Trypsinverdauung,
Glycyl-prolinanhydrid aus Edestin durch Pankreas,
Prolyl-glycinanhydrid }
Leucyl-glycinanhydrid } aus Gelatine und Kollagen durch Autoclaviren mit 1,5%iger Schwefelsäure (GAWRILOW **153)**),
Oxyprolyl-glycinanhydrid aus Gelatine durch Glycerol (FODOR **154)**),
Glycyl-tyrosinanhydrid und Glycyl-alaninanhydrid aus Seidenfibroin mit Glycerol oder im Autoklaven UCHINO **154a)**.

Angeblicher Nachweis von Dioxopiperazin in Peptonen ohne directe Isolirung BLANCHETIÈRE **155/6)**, Abtrennung der freien Peptide durch Carbaminirung; Rest gibt keine Auflösung von $Cu(OH)_2$, Biuretreaktion nach Alkali. Ovalbumin gibt bei trypt. Verdauung konstanten Gehalt an Diketopip.-N. (30—32 % des Gesamt-N). Trypsin bildet bei rohem Ovalbumin mehr als Pepsin, bei koagulirtem etwa ebensoviel. Gelatine liefert bei Pepsin 22,8, bei Trypsin 31,2. In weiteren Mitteilungen hält er es selbst für möglich, daß seine Dioxopiperazine nachträglich aus Aminosäuren entstanden sind **(157)**.

Chemisches Verhalten der Dioxopiperazine. Da dies für die Begründung ihrer Präexistenz wesentlich ist, seien die wichtigsten Angaben hier wiedergegeben. Die leichte Entstehung durch Wasserabspaltung und die Umkehr dieser Reaktion hat ABDERHALDEN (*l. c. 93*) selbst angegeben. Namentlich die leichte Aufspaltbarkeit dieser Anhydride hat ihm **(158)** sogar als Argument gedient, um sie trotz ihrer Enzymfestigkeit (s. u.) als Bausteine betrachten zu dürfen, denn er nimmt an, daß sie im Magen resp. Darm nur durch Säure oder Alkali aufgespalten werden. Für Glycinanhydrid ist dies nach WALDSCHMIDT-LEITZ **159)** auszuschließen, für andere weniger beständige Anhydride möglich. ABDERHALDEN und SCHWAB **160)** haben eine

---

150a) ***N. I. Gawrilow, W. S. Balabucha-Popzova***, Isolir. von Diketopip. etc. Bioch. Zs., **271**, 292, **283**, 62 (1934/5). — 151) ***E. Abderhalden, E. Komm***, Struktur der Proteine. Zs. phys. Chem., **145**, 308 (1925). — 152) ***E. Abderhalden***, Gew. von l-Leucyl-d-glutamins. etc. Zs. phys. Chem., **154**, 18 (1926). — 153) ***N. Gawrilow c.s.***, Anhydr. der Aminosäuren etc. Bioch. Zs., **190**, 278 (1927), **238**, 53 (1931). — 154) ***A. Fodor, R. Schönfeld***, Abbau der Gelatine durch Glycerin etc. Bioch. Zs., **200**, 223 (1928). — 154a) ***T. Uchino***, Part. Abbau des Seidenfibroins. Jl. of Biochem., **20**, 65 (1934); BPh **83**, 20. — 155) ***A. Blanchetière***, Compos. des peptones. C. R., **184**, 405 (1927). — 156) ***Ders.***, L'hydrol. de l'ovalbumine (gélatine) par la trypsine etc. C. R., **188**, 112 (1929), **191**, 1479 (1930). — 157) ***Ders.***, Act. de la pepsine sur les sol. des ac. monoaminés. C. R., **193**, 256 (1931), **196**, 1926 (1933). — 158) ***E. Abderhalden, K. Goto***, Verh. der Ferm. gegen Diketopiperazine. Fermentforsch., **7**, 169 (1923). — 159) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner***, Bed. der Diketopiperazine etc. Ber. Chem. Ges., **58**, 1356 (1925). — 160) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Desmotrope Formen von Diketopiperaz. Zs. phys. Chem., **149**, 100, 298, **152**, 88, **153**, 83, **157**, 140 (1925/6).

ganze Reihe solcher Stoffe synthetisirt, die z. T. in einer leichter hydrolysirbaren Enolform vorliegen, z. T. weiterhin eine Kombination von Aminosäuren + Anhydriden darstellen; einige davon werden durch verd. Alkali, aber auch durch Fermente gespalten, so z.B. Leucyl- [glycyl-tyrosin-anhydrid] **(162)**.

Reaktionskonstanten der alkalischen Hydrolyse für verschiedene Dioxopiperazine LEVENE **163)**; saure Dissoc.-Konstante für Glycyl-glycin kinetisch $K_a = 2\ K_w$, elektrom. $K_a = 8\ K_w$ (v. EULER **164)**).

Fermentresistenz der Dioxopiperazine. Unter den üblichen Reaktionsbedingungen ist Glycin-anhydrid gegen sämtliche Proteasen resistent. Dies hat ABDERHALDEN selbst **(158)** festgestellt; es gilt aber ebenso für einige Kombinationen von Dioxopip. mit Aminosäuren **(165)**; wie auch WALDSCHMIDT-LEITZ **159)** an zahlreichen Dipeptid-anhydriden die Resistenz gegen Pankreastrypsin und Darmerepsin fand. Es fehlen ja tatsächlich alle Angriffspunkte für die bekannten Proteasen, da diese Anhydride weder freies Carboxyl, noch freie Aminogruppen besitzen. Daß einige kombinirte Stoffe, die diese Gruppen führen, ebenso wie durch Alkali auch durch Fermente im Ring zerlegt werden, wie ABDERHALDEN **162)** nun angibt, ist durchaus möglich; und damit ist eine generelle Aussage, daß der Dioxopiperazin-ring gegen Enzyme resistent ist, nicht mehr möglich. Wenn also solche Gebilde im Proteinmolekül vorkommen, würde sich die ganze Sachlage ändern. Dies nimmt nun ABDERHALDEN tatsächlich an, in dem zahlenmäßig beschränkten Sinne, wie er nunmehr überhaupt noch mit einer Anteilnahme von Anhydriden im Proteinmolekül rechnet; und in Anlehnung an SHIBATA bemühen sich neuerdings japanische Forscher, die wesentliche Bedeutung solcher Gebilde nachzuweisen (§ 473).

Im Tierkörper können sie teilweise verschwinden und als N-Quelle benutzt werden; Leucyl-glycinanhydrid kaum, Glycyl-alaninanhydrid erheblich **(166)**.

b) Komplicirtere Anhydridgebilde.

§ 473. Komplicirte Gebilde hat FODOR (l. c. 142) in Form von teilweise anhydrisirten Polypeptidassociaten isolirt und daraus Ansichten über die Struktur der Proteine geschöpft, auf die wir noch zurückkommen (§ 476).

Da aber bei keinem seiner Produkte die Einheitlichkeit oder die Struktur feststehen, wollen wir darauf hier nicht eingehen. Ein angebliches Cyclo-tripeptid (2 Prolin, 1 Leucin) hat SSADIKOW **167)** aus Casein (mit H_2SO_4 im Autoclaven) erhalten, aus Blutalbumin ein analoges mit 2 Leucin zu 1 Prolin, sowie ein Cyclo-leucylvalin; weitere aus Blutalbumin mit H_2SO_4 **(168/9)**).

Die Tatsache, daß manche komplexeren Gebilde durch Enzyme spaltbar sind, wie sie z. B. von ABDERHALDEN (l. c. 162) synthetisch hergestellt sind, hat dazu beigetragen, daß die Annahme von Dioxo-piperazinen mit solchen Anhängseln als Struktur-elementen auf grund früherer Vorstellungen von SHIBATA **170)** neu belebt worden ist. Er versucht

161) ***Dies.***, Weit. Beitr. zur K. der Struktur der Proteine. Zs. phys. Chem., **158**, 66 (1926). — 162) ***Dies.***, Aminosäure (2,5-dioxopiperazin) etc. Zs. phys. Chem., **212**, 61 (1932). — 163) ***P. A. Levene c.s.***, Rel. of chem. structure to the rate of hydrol. of ketopiperazines. Jl. of Biol. Chem., **81**, 697, **86**, 723 (1929/30). S.A. — 164) ***A. Ölander, H. v. Euler***, Kinetik der Dioxopiperazin-spalt. Zs. physikal. Chem., **134**, 381 (1928). — 165) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Verh. von Polyp. geg. Ferm. Zs. phys. Chem., **171**, 78 (1927). — 166) ***E. Abderhalden, S. Buadze***, Verh. von 2,5-Dioxo-piperaz. im tier. Org. Zs. phys. Chem., **162**, 304 (1926/7). — 167) ***W. S. Ssadikow c.s.***, Cyclotripeptid aus Casein. Bioch. Zs., **221**, 304 (1930). — 168) ***W. S. Ssadikow c.s.***, Spalt. von Blutalbumin etc. C. R. Ac. USSR, **2**, 418, 569, **3**, 317 (1934/5); BPh **81**, 204, **82**, 219, **91**, 480. — 169) ***W. S. Ssadikow c.s.***, Bild. von Cyclopeptiden aus Blutalbumin. Bioch. Zs., **278**, 60 (1935). — 170) ***K. Shibata***, Künstl. Substrate für Proteinasen und über die Proteinstruktur. Acta phytochim., **8**, 173 (1934). S.A.

einen Ausgleich mit der sicheren Erkenntnis, daß die üblichen Proteasen nur auf freie Carboxyle oder freie Aminogruppen wirken, dadurch, daß er als Struktur-elemente Dioxo-piperazine mit Seitenketten annimmt. Je nachdem diese eine Aminogruppe haben oder ein Carboxyl, werden sie von Pepsin bezw. Tryptasen gespalten („Cyclopeptidasen") in der Art, daß tatsächlich der Piperazinring zu offenen Peptiden aufgespalten wird. Es soll damit geradezu die Wirkung der beiden Hauptgruppen der Proteinasen erklärt werden.

So wird durch Pepsin z. B. Glycyl-diaminopropionsäure-anhydrid gespalten, durch Trypsin und Kathepsin z. B. die Anhydride von Glycyl-glutaminsäure, Glycyl-asparaginsäure und Asparaginyl-asparaginsäure (ISHIYAMA **171)**). Ferner wird das Anhydrid der Glycyl-aminomalonsäure durch Trypsinkinase zu 55 %, nicht von Pepsin und Erepsin zerlegt (MATSUI **172)**). Ein Tripeptid-anhydrid, nämlich Glycyl-[glycyl-diaminopropionsäure-anhydrid] wird nur durch Tryptase gespalten, nicht von Erepsin und Pepsin, jedoch steht der Ort der Spaltung noch nicht fest, ob nämlich das Glycin der Seitenkette abgespalten oder der Ring geöffnet wird. Daß diese besondere Wirkung der Proteinasen auch bei Anhydriden natürlicher Aminosäuren mit freiem NH_2 eintritt, will TAZAWA **173)** an Argininanhydrid und Lysinanhydrid gezeigt haben, die er synthetisch hergestellt hat. Sie zerfallen von selbst als freie Basen durch eigene Alkalinität, aber noch nicht bei ph = 8. Dann wirkt aber auch Trypsin nicht, während Pepsin die an sich sehr beständigen Chlorhydrate aufspaltet. (ph = 2,2—2,4). Es entstehen Dipeptide, die durch Dipeptidase spaltbar sind.

c) Sonstige Ringbildungen.

§ 474. Die Struktur der Peptide bietet an sich natürlich die Möglichkeit verschiedenartigster Ringbildungen; und es sind auf grund präparativer und synthetischer Arbeiten Anregungen gegeben worden; aber die Hauptfrage, ob irgend eine solcher Formen im Eiweißmolekül präformirt ist und somit als weiteres Strukturelement neben normalen Peptidketten und vielleicht normalen Dioxopiperazinen in Betracht kommt, ist in keiner Weise weiter gefördert worden.

Am meisten hat die zuerst von KARRER (H. W. S. 806) **174)** ausgesprochene Annahme Anklang gefunden, daß Derivate eines isomeren resp. desmotropen Dioxo-piperazins mit der Bindung — C(OH) = N —, also eines Dihydro-pyrazins vorkommen könnten. KARRER hat Derivate dieses desmotropen Glycin-anhydrids dargestellt; ABDERHALDEN und SCHWAB (l. c. 160—162) glauben das desmotrope Anhydrid selbst, ebenso Leucyl-glycinanhydrid in Händen gehabt zu haben. Auch BERGMANN **175/6)** hat in verschiedenen Varianten isomere Dioxopip. dargestellt, und zwar sind von manchen drei verschiedene tautomere Formen in reinem Zustande bekannt geworden. ABDERHALDEN hält es für durchaus möglich daß anstatt normaler Dioxopiperazine solche Gruppirungen im Eiweiß vorliegen, da sie viel leichter spaltbar sind. Vor Allem vertritt FODOR (l. c. 142) die Idee, daß solche desmotropen Formen sowohl an freien Polypeptiden wie an Anhydriden beim Abbau eine Rolle spielen, worauf wir § 476 noch zurückkommen werden. Andere Möglichkeiten sind die Ausbildung von Imidazolringen (Glyoxalone) (KARRER), die bei ihm von GRAENACHER **177)** synthetisch näher untersucht worden ist, und die

171) ***T. Ishiyama,*** Ferm. Aufschliessung des Diketopip.-Rings. Jl. of Biochem., **17,** 285 (1933). S.A. — 172) ***I. Matsui,*** Konst. der Polypeptide etc. Jl. of Biochem., **17,** 253 (1933), **20,** 141 (1934). S.A. — 173) ***Y. Tazawa,*** Synthese des d-Argininanhydrids und Ringspaltung durch Pepsin. Acta phytochim., **8,** 331 (1935). S.A. — 174) ***P. Karrer c.s.,*** Anhydride von Aminosäuren etc. Helv. Chim. Acta, **7,** 763, **8,** 203, **9,** 336 (1924/6). S.A. — 175) ***M. Bergmann, A. Miekeley,*** Umlag. peptidähnl. Stoffe. Zs. phys. Chem., **140,** 128 (1924). — 176) ***M. Bergmann c.s.,*** Isomere Dioxo-piperazine. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **448,** 32, 38, **458,** 40 (1926/7). S.A. — 177) ***Ch. Gränacher, M. Mahler,*** Glyoxalone etc. als Anhydr. von Aminosäureder. Helv. Chim. Acta, **10,** 246 (1927).

zuerst von BERGMANN (*l. c. 4a*) **176)** speziell für Serin-peptide angeregte von Oxazolen, resp. Oxazolinen, die KARRER ebenfalls in etwas anderer Richtung weiter bearbeitet hat; auch Metoxazine sind (von Asparaginsäure aus) denkbar.

Aber alle diese Arbeiten wurden nur im Hinblick auf die Möglichkeit solcher Ringstrukturen durchgeführt; keiner der Autoren zieht daraus den Schluß, daß sie wirklich vorkommen.

Nur TROENSEGAARD (*l. c. 119, 120,* **178/9**) hält daran fest, daß in den Proteinen Pyrrolringe die primären Bausteine sind, aus denen die Peptide erst secundär entstehen. Seine mannigfach variirten Versuche sind hauptsächlich wieder aus dem Gesichtspunkt der „kleinen Grundkörper" heraus angestellt, so die mit Acetylirung, Molgewichtsbestimmungen nach Dispergirung etc. Die reduktive Spaltung der Acetyl-proteine ergibt neben einem überwiegenden sauren Bestandteil basische heterocyclische Stoffe, die den „Eiweißkern" darstellen sollen, ebenso die Acetylspaltung allein. Neben den Pyrrolen treten auch Piperidin u.ä. Basen auf **(179)**. Eine Kritik der Einzelangaben erübrigt sich, sie können alle richtig sein; aber ein Beweis, daß irgend etwas von diesen Strukturen im Protein vorkommt, ist nicht geführt, und nach unseren heute geltenden Anschauungen ist dies auch sehr unwahrscheinlich. Zwei von den von TROENSEGAARD isolirten Basen konnten von WREDE **180)** als 2-Methyl- resp. 2-Isopropylpiperazin identificirt werden (Vergleich von synthetischen Produkten mit den aus Gliadin erhaltenen Basen). Im Gliadin soll ein Pyrrolkern vorhanden sein, der nur bei tryptischer, nicht bei Pepsinverdauung nachweisbar ist (RONCATO **181)**). EMERSON u. SCHMIDT (l.c. 126) konnten einen angegebenen Pyrrolkörper im Glutin nicht finden.

Zu ähnlichen Vorstellungen waren SSADIKOW und ZELINSKY (*l. c. 122*) gelangt, die sie weiter verfolgt haben **(182—183a)**. Nach ihrer Ansicht sind die bei der Autoklavenhydrolyse mit verdünnten Säuren entstehenden Ringgebilde präformirt im Proteinmolekül. Sie schließen dies aus dem Befund, daß der NH_2-Stickstoff sich nicht verringert, sondern vermehrt, sowie daß Dipeptide sich im Autoklaven nicht anhydrisiren. Sie denken bei diesen präformirten Anhydriden auch an einfachere Dioxopiperazine (l. c. 153), an cyclische Tripeptide (l. c. 167—169), wie auch an andere nicht näher zu kennzeichnende Gebilde.

3) Kyrine und Peptone.

§ 475. Über diese höheren Komponenten des Eiweißaufbaus ist in neuerer Zeit nur wenig gearbeitet worden. Es hat dies seinen guten Grund. Die frühere Zeit hatte die Schwierigkeiten der Aufklärung des Eiweißbaus ganz wesentlich unterschätzt und glaubte mit recht primitiven Methoden zu einem Ziele zu gelangen. Die Folge war die ungeheuerliche Verwirrung, die wir im H. W. bereits nur noch aphoristisch geschildert haben, da die Zeit dieser Art von „Aufklärung" bereits vorüber war. Heute wissen wir, wie völlig untauglich diese Methode war, wissen aber auch, daß unsere jetzige Methode noch erheblicher Verfeinerung bedarf, um an die Struktur dieser längeren gemischten Ketten heranzugehen.

Über die **Kyrine** liegen einige wenige Versuche vor, mit moderner Methodik ihrem Aufbau näherzukommen. GRASSMANN **184)** kam mit einem schonenden Verfahren der Hydrolyse von Gelatine zu einem Produkt, das dem Kyrin von SIEGFRIED ähnlich war.

Das Präparat erhielt an freien Aminosäuren, also als Verunreinigung, nur 1 % Histidin, sonst alle in gebundener Form. Es enthielt 66,6 % Basen-N, 33,3 % Monoamino-N; Ring-N nach vollständiger Hydrolyse 44 %. Da Tryptophan und Histidin fehlten, war dieser cyclische Anteil Prolin und Arginin. Aus den Zahlen ergibt sich, daß der basische Anteil aus Arginin + Lysin 1 : 1 besteht. Dazu kommt 1 Prolin, 2 einfache Mono-aminosäuren. Diese sind aber nicht exakt bestimmbar; Glutaminsäure fehlt, Glycin und Alanin vorhanden, Leucin überwiegt.

---

178) ***N. Troensegaard c.s.***, Zusammensetzung der Proteine. Zs. phys. Chem., **133**, 116, **134**, 100, **142**, 35, **153**, 93, **184**, 147 (1924/9). — 179) ***Ders.***, Acetylbasen aus Proteinen. Zs. phys. Chem., **193**, 49, 171 (1930), **199**, 133 (1931). — 180) ***F. Wrede c.s.***, Isolirung von substit. Piperazinen etc. Zs. phys. Chem., **200**, 133 (1931). — 181) ***A. Roncato***, Pres. di nuclei pyrrol. nell' idrolizzato tript. di gliadina. Boll. Soc. Ital. Biol., **8**, 801; Arch. di Sci. Biol., **19**, 81 (1933). — 182) ***N. D. Zelinsky c.s.***, Zur Frage des anhydridartigen Char. der Eiweißstoffe. Bioch. Zs., **182**, 11, 18 (1927). — 183) ***W. S. Ssadikow c.s.***, Spaltg. des Eieralbumins etc. Bioch. Zs., **276**, 168 (1935). — 183a) ***N. I. Gawrilow c.s.***, Dynamik der Autoklavenhydrol. Bioch. Zs., **182**, 26 (1927). — 184) ***W. Grassmann, O. Lang***, Kyrine. Bioch. Zs., **269**, 211 (1934). S.A.

Lysin und Arginin konnten isolirt werden. Es liegen also jedenfalls der Hauptsache nach 5 Aminosäuren vor. Nun sind aber 3 N als freies NH_2 vorhanden, eine NH_2-Gruppe entfällt auf das Lysin, zwei auf die Kette. Prolin ist am Imino-N gebunden. Das Kyrin ist also kein Pentapeptid, sondern sehr wahrscheinlich ein Gemisch von Di- und Tripeptid. Das gilt schon, wenn man die zwei Mono-aminosäuren als konstant ansieht; da dies aber auch nicht der Fall ist, so muß man auch dies bisher best untersuchte Kyrin als ein Gemisch mehrerer niederer basisch betonter Peptide ansehen, dessen einzelne Bestandteile innerhalb eines ungefähr gleichen Aufbauplans wechseln können. Aminopolypeptidase und Nierenextrakte spalten völlig auf. Später (185) gelang die präparative Trennung in ein Dipeptid aus Arginin + 1 nicht cyclischen Monoaminosäure (weder Glycin noch Glutaminsäure) und ein Tripeptid aus Prolin, Lysin, Glycin, und zwar nach dem enzymatischen Verhalten Lysyl-prolyl-glycin. Glycin ist auch im Kyrin selbst endständig (l. c. 134a).

Aus Globin erhielt 1906 KIRBACH ein Kyrin, das HAUROWITZ **186)** wieder untersucht hat. Es ist ein Gemenge von Histidinpeptiden und anderen.

POSTERNAK 187) erhielt aus Casein durch Trypsinverdauung mehrere kyrinähnliche Stoffe mit 14—18 N auf 4 P aus der Serin-Phosphorsäure. Er glaubt, daß der „Kern" des Caseinmoleküls aus einem Komplex von 4 Serin-Phosphorsäuren besteht (Näh. § 477a). Solcher **Lactotyrine** hat er 4 verschiedene isolirt. Analoge Stoffe liefern das Vitellin des Eidotters (Ovotyrine) und die Ichthuline (Ichthyotyrine) (188), 189)). Die Ovotyrine enthalten weniger N, haben also kürzere Ketten. Diese Stoffe würden also an der unklaren Grenze zwischen Kyrinen und Peptonen stehen, wenn sie einheitlich wären, was sie wohl sicher nicht sind. Tatsächlich haben bei dem Abbau mit Tryptase RIMINGTON und GRABAR ganz andere Stoffe („Phosphopeptone") erhalten, über die wir § 477a berichten werden.

Über **„Peptone"** im älteren Sinne ist kaum noch weiter gearbeitet worden, wenigstens nicht zum Ziel ihrer Strukturaufklärung; wir wissen von ihnen tatsächlich noch nichts, was über den einfachen Abbau der komplicirten Gemische hinausgeht; wir wissen noch nicht einmal, ob das normale Pepton nichts weiter ist als eine etwas längere Polypeptidkette, oder ob es noch besondere Strukturen (§ 476a) enthält. Nur die „Peptone" aus Caseinogen, Protaminen und Seidenfibroin haben mehr Beachtung gefunden, und zwar wegen ihrer erheblichen Bedeutung für die besonderen Strukturfragen bei diesen abseits stehenden Proteinen. Hier sind besonders von Interesse, die aus Seidenfibroin durch Säurespaltung erhaltenen, die aus höheren Polypeptiden bestehen; sowie vor Allem die des Caseinogens (**„Paranuclein"** und **„Phosphopepton"**). Auf diese kommen wir bei der Besprechung dieser Strukturfragen § 477 zurück.

Mit sonstigen Peptonen hat sich analytisch, so viel ich sehe, nur FODOR **190)** beschäftigt. Er fand in einem Pepsin-Pepton aus Gelatine ganz ähnliche „Associate" von Polypeptiden wie bei seinen Versuchen mit Glycerol etc. (l. c. 142). Nach den von FRANKEL **191)** ausgeführten kryoskopischen Molgewichtsbestimmungen soll es sich um ein Hexapeptid + einem Tripeptid handeln, ferner um Associate davon (Molatgew. = 520, 700). Hierzu sei nur noch erwähnt, daß SSADIKOW (l. c. 167) peptonähnliche Stoffe bei kürzerem Erhitzen von Casein im Autoclaven mit wäss. Ammoniak erhalten hat. — Ein Fleischpepton enthielt endständiges Glycin, ebenso ein Glutinpepton-WITTE (ZIMMERMANN, l. c. 134a).

---

185) ***W. Graßmann, K. Riederle,*** Glutokyrin. Bioch. Zs., **284,** 177 (1936). — 186) ***F. Haurowitz,*** Partielle Hydrolyse des Globins. Zs. phys. Chem., **162,** 41 (1926). — 187) ***S. Posternak,*** Noyau phosphoré de la caséine. C. R. Soc. Phys. Genève, **44,** 8 (1927); C. R., **184,** 306, **186,** 1762 (1927/8); Biochem. Jl., **21,** 289 (1927). — 188) ***S. u. Th. Posternak,*** Polypept. conten. le noyau phosph. et ferrique de l'ovovitelline. C. R., **184,** 909, **185,** 615, **187,** 313 (1927/8). — 189) ***S. u. Th. Posternak,*** Noyau phosph. de l'ichtuline etc. ibid. **197,** 429 (1933). — 190) ***A. Fodor, Ch. Epstein,*** Frakt. des Gelatinepeptons etc. Bioch. Zs., **228,** 310 (1930). — 191) ***M. Frankel, S. Kuk,*** Darst. und Mol.-Grösse von Gelatinepepton. Bioch. Zs., **222,** 240 (1930).

Abgeschlossen: 20. 6. 36. Ber. Phys. 93. H. 1/2.

IV. Spezielle Strukturfragen

(mitbearbeitet von Dr. W. Roman).

1) Proteinstruktur im Allgemeinen.

§ 476. Wie wir in der Einleitung generell geschildert haben, ist es vorläufig noch ganz unmöglich, sich ein genaueres Bild vom Aufbau der Proteine zu machen. Es ist zwar heute so ziemlich einheitlich die Meinung aller maßgeblichen Forscher, daß die Hauptstruktur dadurch wiedergegeben ist, daß man lange Ketten in echter Polypeptidbindung annimmt. Wir wollen hier auch gänzlich die weitere in der Einleitung berührte Frage nach dem Charakter dieser Ketten zurückstellen, da wir davon nichts wissen. Wir wissen nicht, wie lang diese Ketten sind, d.h. ob sie an sich schon in das kolloidale Bereich hineinführen; oder ob grundsätzlich stets noch weitere Bindungen zwischen den Ketten vorliegen, seien es strukturelle oder associative. Wir wissen auch nicht, ob grundsätzlich das natürlich gegebene Molat aus zahlreichen Ketten mit an Art wenigen Gliedern besteht, oder ob jede Kette in echter Peptidbindung viele verschiedene Aminosäuren enthält. Bei den allermeisten Proteinen wird wohl wie es scheint diese Frage damit zusammenhängen, daß sie nicht „rein" sind, d.h. daß eben noch verschiedene Arten von Ketten zusammen kristallisiren, „Mischmicelle" nach K. H. Meyer bilden, wie dies beim Seidenfibroin nachgewiesen ist, und auch für andere Proteine diskutirt wird. Auf die röntgenographischen Einzeldeutungen gehen wir im Zusammenhang mit den am besten gesicherten Ergebnissen an Keratin und Gelatine § 477 ein.

In diesen Fällen, und besonders beim Seidenfibroin, können wir also damit rechnen, daß jede Hauptvalenzkette nur aus einer geringen Anzahl verschiedener Glieder besteht; der eigentliche „Seidenkristall" enthält sogar wahrscheinlich nur Glycin und Alanin. Aber das Seidenfibroin steht so abseits von den echten Proteinen, daß dieser Einzelfall sehr wenig besagt. Bei den eigentlichen Proteinen scheint es anders zu sein. So wird für das weitgehend gereinigte Ovalbumin diskutirt (Sørensen, Svedberg, § 476a), daß es aus einer einzigen Hauptvalenzkette im Molekül besteht; und dann müßte man eben alle in ihm vorhandenen Einzelglieder als in einer Kette fortlaufend aneinander gebunden betrachten, bis das volle Molgew. erreicht ist.

Ist diese Annahme richtig, so gewinnt eine Berechnung von Calvery **192)**, die an ganz reinem Ovalbumin angestellt ist, eine gewisse grundsätzliche Bedeutung. Er legt ein Molgew. von 34.000 zu grunde, bestimmt die einzelnen Bausteine und berechnet für diese ein durchschnittliches Molgew. von 126. Unter Berücksichtigung des abgegebenen Wassers erhält er dann ca. **270 Peptidbindungen** in 1 Mol. Ovalbumin. Das wäre also die Kettenlänge, wenn es sich tatsächlich um eine Hauptvalenzkette handelt.

Wir wollen uns aber hier nicht erneut mit diesen grundsätzlichen Problemen in ihrer Allgemeinheit näher beschäftigen, da eine Entscheidung nicht möglich ist. Was hier zu behandeln übrig bleibt, sind einige Specialfragen, die auch dann noch offen bleiben, wenn wir als Grundlage die regulären offenen Peptidketten acceptiren. Es bleiben dann immer noch zwei Gruppen von Problemen offen. Erstens die Frage, wie die Endgruppen aussehen. Da man bisher meist der Ansicht ist, daß der enzymatische Abbau hauptsächlich an Aminogruppen resp. Carboxylen, auf den ersten Blick

---

192) ***H. O. Calvery***, Cryst. egg albumin. Jl. of Biol. Chem., **102**, 73 (1933). S.A.

also an Kettenenden ansetzt *) (auf die Annahme BERGMANN's, daß die Papainasen an Amidgruppen ansetzen, kommen wir zurück), so hat diese Frage ein unmittelbar enzymtypisches Interesse. Es ist natürlich an sich durchaus möglich, daß die abweichende Specifität der Proteinasen gegenüber den Peptidasen nur auf der Länge der Ketten beruht, also den Verhältnissen bei Cellobiase und Cellulase entspricht; es ist aber ebensogut möglich, daß das Kettenende eine besondere Struktur trägt, und somit die Proteinasen eine dadurch bedingte Strukturspecifität gegenüber den Peptidasen haben, — also wie man das ebenso hypothetisch für Stärke und Amylasen erörtert. Das ist diskutirbar, und es werden sogar bestimmte Strukturen in Betracht gezogen, wobei es sich natürlich wieder in erster Linie um irgendwelche Anhydridbildungen handelt. Dagegen spricht nun aber wieder, daß man gerade umgekehrt anhydrische Endstrukturen für die resistenten Skleroproteine diskutirt, und somit eine Art Parallelität zwischen anhydrischen Kettenenden und Fermentresistenz zu schaffen versucht.

Das andere Hauptproblem ist die Kette selbst. Es steht zur Erörterung, ob alle Innenbindungen echte Peptidbindungen —CO—NH— sind, oder ob hier Abweichungen vorkommen. Auch dafür sind verschiedene Anregungen gegeben, so die Verknüpfung zweier Ketten an den NH_2-Gruppen durch CO in einer Ureid-Bindung (BRIGL), die man mit gleichem Recht auch als „End-gruppirung" bezeichnen könnte. Weiter die Frage, ob auch die zweiten polaren Gruppen der Dicarbonsäuren und der Diaminosäuren an Peptidbindungen teilnehmen oder sämtlich freie Seitenketten sind.

Daneben spielt eine große Rolle die Frage, ob etwa einige oder alle Peptidbindungen nicht in der Keto-Amidform, sondern in der desmotropen Enolform vorliegen (R.C(OH) = N—R'), dadurch also leichter hydrolysirbar sind (ABDERHALDEN, FODOR). Umgekehrt wird aber diskutirt, daß gerade die Hydrolyse, zum mindesten die enzymatische, darauf beruht, daß die stabile Form, wie sie in den genuinen Proteinen vorliegt, zuerst in die Enolform umgewandelt wird; darauf beruht die Theorie des „ersten Angriffs" von BERGMANN (§ 480). Diese desmotropen Formen werden weiterhin mit der Möglichkeit in Verbindung gebracht, daß sich an ihnen selbst Querverbindungen zwischen den Ketten ausbilden, seien es rein strukturelle, seien es associative Bindungen. Das hat natürlich nichts damit zu tun, daß man an weitere reine Strukturbindungen (Hauptvalenzbindungen) an den Oxygruppen durch Aetherbildungen gedacht hat, resp. an analoge Disulfidbindungen an den SH-Gruppen. Auch dieses Problem haben wir zu behandeln, sowie endlich auch die Frage von polaren Bindungen (Salzbildungen) zwischen den Ketten. Und endlich stehen über allen diesen rein chemisch bedingten Strukturen noch die weiteren Fragen nach dem räumlichen Aufbau des Micells, bedingt durch associative Kräfte nicht nur zwischen den einzelnen Hauptvalenzketten, sondern auch innerhalb der Ketten selbst, die ihre einzelnen Glieder gegeneinander verschieben, so daß zickzackförmige oder noch komplicirtere Strukturen entstehen (ASTBURY). Damit haben wir ungefähr den Rahmen, in dem sich diese Erörterungen bewegen. Alle diese Probleme im Einzelnen näher zu erläutern, ist eine fast unlösbare Aufgabe. Jedenfalls ist es nicht zu vermeiden, daß diese Ausführungen in den Einzelheiten recht oberflächlich bleiben müssen.

---

*) Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei betont, daß sich dies nur auf die Affinität bezieht, eben das „Ansetzen". Die Spaltung selbst erfolgt ja stets an einer Peptidbindung, und es steht zur Wahl, ob dies die nächst benachbarte ist, wie bei den Peptidasen, oder eine weiter entfernte, wie sicher beim Pepsin, wahrscheinlich bei allen Proteinasen, so daß die Spaltung in der Kettenmitte erfolgt. Im Übrigen wird für die Proteinasen meist angenommen, daß sie primär an freien polaren Gruppen der Kettenmitte ansetzen. Über diese Fragen s. §§ 478 ff.

Erstens ist für keine dieser Theorien auch nur in einem einzigen Punkte ein schlüssiger experimenteller Beweis erbracht. Selbst wenn man die vielen an sich zweifelhaften „Zwischenprodukte", denen wir begegnet sind, für reell und gesichert ansehen wollte, was an sich schon durchaus unwahrscheinlich ist, so ließe sich daraus immer noch kein Bild für den Bau der Proteine selbst gewinnen. Zweitens sind die Theorien selbst z. T. sehr unklar und nur aphoristisch angedeutet. Drittens so zerstreut in allen möglichen Arbeiten der Autoren und an sich so vielfach abgeändert, daß man häufig wirklich nicht klar sehen kann, was der Autor eigentlich will. Und was die Sache vielleicht am meisten erschwert, ist der Umstand, daß diese Theorien vielfach noch aus dem Gesichtspunkt der „kleinen Grundkörper und der Association" heraus geschöpft worden sind, und man mithin Gefahr läuft, irgend etwas als die Ansicht eines Forschers hier anzuführen, was er vielleicht unter dem neuen Gesichtswinkel längst aufgegeben hat. Das, was wir hier geben können, sind also im Großen und Ganzen nur einige aphoristische Hinweise. Dazu sei noch auf einige neuere zusammenfassende Darstellungen **(193—197)** verwiesen.

Die Endgruppen. Die Annahme, daß bei den dem enzymatischen Abbau zugänglichen genuinen Proteinen die Endgruppen „frei" sind, das heißt, daß am einen Ende die positiv geladene $[H_3N\ldots]^+$-Gruppe, am anderen Ende ein freies Carboxyl $[\ldots COO]^-$ steht, beruht auf einem Analogieschluß zu der Wirkung der Peptidasen, die ja nur dann wirken, wenn ihnen entweder ein solches freies Carboxyl (Carboxy-polypeptidasen) oder eine freie Aminogruppe zum Ansetzen zur Verfügung steht (Di- und Aminopolypeptidasen). Da dann stets nur die dem Ansatzpunkt am nächsten stehende Peptidbindung gelöst wird, so geht diese Annahme zwangsläufig mit der Vermutung einher, daß auch der Abbau der Proteine — zunächst durch die gebräuchlichsten Proteinasen — auch durch Ansetzen an diesen „freien" Enden erfolgen sollte. Aus einem weiteren Analogieschluß, daß es nämlich für Di- und höhere Peptide bei sonst gleicher Struktur zwei verschiedene Enzymgruppen gibt, könnte man dann weiter folgern, daß es auch für noch längere, also Proteinketten, je eine weitere Enzymgruppe für das Amino-Ende und das Carboxyl-Ende gibt; und dann ist es aus längst bekannten physikochemischen Gründen (NORTHROP) selbstverständlich, daß Tryptasen den Carboxy- und Pepsinasen den Amino-polypeptidasen entsprechen. Aber schließlich waren das eben reine Analogieschlüsse, ganz abgesehen davon, daß dann für die „dritte Gruppe" der Proteinasen, die Papainasen, keine bevorzugte Angriffsstelle mehr übrig blieb. Daß BERGMANN (l. c. 207) neuerdings dazu neigt, die specifische Angriffsstelle dieser Enzymgruppe in die Kettenmitte an Amidbindungen zu verlegen, wird uns § 478a beschäftigen. Aber auch für die sicherlich an verschiedenen Gruppierungen ansetzenden Pepsinasen und Tryptasen blieb die Möglichkeit stets bestehen, daß dieser Analogieschluß falsch ist und die Proteinasen-wirkung nicht an normalen freien Enden nur längerer Ketten, sondern an besonderen Strukturen ansetzt; und dann können diese sich a priori ebensogut an den Ketten-enden, wie in den Ketten selbst befinden, nämlich als Seitenketten (§ 476a).

Für besondere Strukturen gab es immer schon indirekte Hinweise, so die bekannte Tatsache, daß bei der Bildung von „Peptonen" zum mindesten die Cystingruppen, zum erheb-

---

193) ***E. Waldschmidt-Leitz***, Struktur der Proteine. Chem. Weekblad, **27**, H. 18 (1930). S.A. — 194) ***M. Bergmann***, Z. K. der Eiweißbausteine etc. Naturw. **1930**, 465, **1932**, 941. S.A. — 195) ***Ders.***, Synthesen und Enzymvers. im Eiweißgebiet. Klin. Ws. **1932**, H. 38. S.A. — 196) ***Ders.***, Rec. res. in the field of proteins etc. Jl. Am. Leather Chem. Ass., **29**, 353 (1934). S.A. — 197) ***K. Linderstrøm-Lang***, Anw. von Enz. zur Konst.-Ermittl. der Proteine. Erg. Phys., **35**, 415 (1933). S.A.

lichen Teil aber auch die Tyrosingruppen abgespalten werden, Tatsachen, die auch heute noch keine sichere Erklärung gefunden haben (§ 478a). Für besondere Struktureinflüsse sprechen auch einige Beobachtungen, daß bei gewissen definirten Polypeptiden, z. B. der Asparaginsäure, plötzlich die Peptidasenwirkung versagt, und nur noch Trypsin, d. h. die aktivirte Proteinase wirkt. Ganz einwandfrei ist dies natürlich nur bei Dipeptiden theoretisch zu verwerten, weil für Polypeptide ja die Carboxypolypeptidase am „Trypsin" hängt; hier wären also nur Versuche zu berücksichtigen, die diese Fehlerquelle ausschließen. Die Angabe allein, daß nur kinasirtes Trypsin wirkt, genügt dafür nicht, denn auch die Carboxypolypeptidase bedarf, wenn auch nicht unbedingt, der Kinase. Auf Einzelheiten werden wir erst beim Kapitel Peptidasen, Specifität zurückkommen.

Hier sei nur als Beispiel angeführt, daß zuerst SUZUKI **198)** das d, l-Asparagyl-di-l-tyrosin als resistent gegen Erepsin, spaltbar durch Trypsin-Kinase angab, während alle ähnlich gebauten (z.B. mit Glycin), oder mit Asparaginsäure am Ende, durch Erepsin gespalten werden (GRASSMANN **199)**), darunter auch Asparagyl-asparagin (MIYANOKI **199a)**). Dagegen ist für das von MATSUI **200)** angegebene Beispiel des Asparagyl-diglycyl-tyrosins, das ebenfalls nur durch Trypsin-Kinase spaltbar ist, die Beziehung zur Carboxy-polypeptidase nicht auszuschließen. Da schließlich auch das Asparagyl-di-l-tyrosin kein normales Dipeptid ist, so ist die Sache noch nicht geklärt. Ein von BERGMANN **201)** synthetisirtes Asparagyl-tyrosin hat die freie Aminogruppe in β und ist dementsprechend überhaupt fermentfest; dasselbe gilt für ein von E. FISCHER dargestelltes Asparagylglycin **(199)**. Das Glutaminyl-tyrosin verhält sich normal.

BERGMANN **202)** hat ein synthetisches Substrat für kristallisirtes Trypsin gefunden, das als einzige Angriffsgruppe ein freigebliebenes Carboxyl an einer Glutaminsäure, aber nicht am Kettenende, besitzt; es ist Carbobenzoxy-glycyl-glutaminyl-glycin-aethylester.

Es ist also möglich, daß die tryptische Wirkung am freien Ende oder in den Seitenketten besondere Strukturen vorfinden muß, im einfachsten Falle gebildet von speciellen Aminosäuren in normaler Peptidbindung. Hier scheint im Eiweiß selbst das Tyrosin eine besondere Rolle zu spielen. Daß bei der tryptischen Verdauung neben Peptonen eine relativ große Menge Tyrosin frei wird, ist, wie erwähnt, seit langem bekannt, und andererseits haben Modellversuche an Polypeptiden gezeigt, daß gerade Tyrosin als Endgruppe die Betonung des Carboxyls als Angriffsgruppe hervorruft, also zu stärkerer Ionisirung führt. WALDSCHMIDT-LEITZ **203)** gibt z. B. an, daß das Pentapeptid Leucyl-triglycyl-tyrosin nur von „Trypsin", d. h. eben von Carboxy-polypeptidase **(204)** angreifbar ist, und zwar wird eben das Tyrosin abgespalten. Dann ist das verbleibende Tetrapeptid der Aminopolypeptidase zugänglich. Ebenso werden Tyrosyl-tyrosin und Tyrosyl-arginin als einzige Dipeptide außer von Dipeptidase auch von „Trypsin" angegriffen (BERGMANN **201)**), also wie BERGMANN selbst meint von Carboxypolypeptidase. Auch Tryptophan wird bei tryptischer Verdauung besonders aus Casein schnell abgespalten (RAGINS **205)**) (vgl. § 467). Weiteres § 478a.

Andererseits kann die Natur der Endgruppe in Bezug auf ihre Angreifbarkeit durch das nächste Kettenglied stark beeinflußt werden. So z.B. hat BERGMANN **206)** gezeigt, daß bei gewissen Substituirungen von Acyl in die NH_2-Gruppe von Aminosäuren eine große Neigung zur Racemisirung erzielt wird, durch andere nicht (Acetyl ja, Chloracetyl nein). Diese Racemisirung beruht auf einer Enolisirung am α-C, in der Form $R\cdot CO\cdot NH\cdot \underset{\displaystyle R}{\overset{|}{C}} = C<^{OH}_{OH}$.

---

198) ***K. Suzuki,*** Konst. der Polypeptide. Jl. of Biochem., **13,** 57 (1931). S.A. — 199) ***W. Graßmann c.s.,*** Zur Kenntnis der Hefeasparaginase. Zs. phys. Chem., **214,** 185 (1932), Bioch. Zs. **268,** 214, **273,** 452 (1933/4). — 199a) ***Y. Miyanoki,*** Konst. der Polypeptide. Jl. of Biochem., **13,** 389 (1931). S.A. — 200) ***J. Matsui,*** Konst. der Polypeptide. Jl. of Biochem., **17,** 163 (1933). S.A. — 201) ***M. Bergmann, L. Zervas c.s.,*** Dipept. mit vorw. sauren Eigensch. etc. Zs. phys. Chem., **224,** 17 (1934). S.A. — 202) ***M. Bergmann c.s.,*** Synth. peptides as substrate for trypt. proteinase. Science **1935,** I, 180. — 203) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann, H. Schlatter,*** Spec. proteol. Enz. Ber. Chem. Ges., **60,** 1906 (1927). S.A. — 204) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Proteinase und Carboxy-polypeptidase. Ber. Chem. Ges., **62,** 2217 (1929). — 205) ***I. Kraus Ragins,*** Rate with which tryptophan is liberated from proteins by enz. Jl. of Biol. Chem., **80,** 551 (1928). — 206) ***M. Bergmann, L. Zervas,*** Katal. Racem. von Aminos. etc. Bioch. Zs., **203,** 280 (1929).

Vielleicht ist aber eben diese Enolisirung wichtig für den Enzymangriff, und dann wären die beiden letzten Glieder entscheidend (§§ 479a, 480).

Es ist aber ebensogut möglich, daß auch diese Erklärungsversuche für die specifische Proteinasenwirkung nicht ausreichen, daß vielmehr ganz andere Strukturen an den Endgruppen ausgebildet sind. Dafür werden nun neuerdings wieder anhydrische Bildungen herangezogen, also im einfachsten Fall Dioxopiperazine, die aber nicht mehr isolirt zu betrachten sind, und nicht als einzige oder auch nur vorwiegende Grundkörper, sondern als singuläre am Ende der Kette stehende Bildungen. Dann sind es also Dioxopiperazine „mit Seitenketten", und für solche hat ABDERHALDEN (l. c. 162) die enzymatische Spaltbarkeit im Piperazinkern, d. h. die Aufklappung der Anhydride nachgewiesen.

Im Anschluß daran hat, wie § 473 erwähnt, SHIBATA (l. c. 170) die Annahme vertreten, daß die eigentlichen Proteinasen eine ausgesprochene Specifität zu diesen cyclischen Endgruppen haben, Cyclopeptidasen sind, und zwar in dem Sinne, daß die Tryptase auf Cyclopeptide mit sauren „Seitenketten", das Pepsin auf basische Seitenketten eingestellt ist; und andere japanische Forscher (l. c. 171—173) haben sich bemüht, diese Theorie an Modellreaktionen mit synthetischen Stoffen zu stützen. Der Schönheitsfehler dieser Theorie, daß für die Papainasen keine so einfache Deutung bereit steht, ist durch den Zufall beseitigt, daß ganz unabhängig davon BERGMANN 207), 207a) neuerdings zu beweisen versucht, daß Papainasen überhaupt nicht an den Endgruppen, sondern in der Mitte angreifen, an zwei benachbarten CO-NH-Gruppen, worauf wir § 479a zurückkommen. Im übrigen hat WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 245a) die Befunde der japanischen Forscher in keinem Falle bestätigen können.

Dafür, daß an den entscheidenden Endgruppen der Proteine keine freien NH_2-Gruppen stehen, könnte man allenfalls noch den Befund von MASUI 208) anführen, daß Pepsin und Trypsin das Methylencasein ebenso gut spalten wie Casein selbst. Auch Benzylidenclupein wird gespalten (§ 477).

Eine Nachprüfung dieser Versuche und eine kritische Wertung der daran geschlossenen Theorien wäre um so wichtiger, als WALDSCHMIDT-LEITZ 209) nun gerade die anhydrische Endstruktur als Merkmal der fermentresistenten Proteine in Anspruch nimmt, die nach seiner Ansicht auch durch die Röntgendiagramme am Seidenfibroin gestützt wird. Allerdings denkt er dabei nicht an kleine Ringe nach Art der Dioxopiperazine, sondern an eine Anhydrid-bildung von einem Kettenende zum anderen zu langgestreckten Ringen. Denn sowohl aus Keratin wie aus Seidenfibroin entstehen beim chemischen Abbau höhere Polypeptide.

Auf die Strukturfragen und die eingeschränkte Enzymresistenz des Seidenfibroins kommen wir im Zusammenhang § 477 zurück. Soweit diese Vorstellung auch für das Prototyp der fermentfesten Skleroproteine, die Keratine gelten soll, wird sie dadurch in den Hintergrund gedrängt, daß hier nach GODDARD und MICHAELIS 210) als ausschlaggebend nicht eine Anhydrisirung, sondern eine Dehydrirung der SH-Gruppen für die Resistenz in Frage kommt, die als —S—S-Brücke in der Quere die Ketten verbindet. Auch darauf kommen wir § 477 zurück; auf die Enzymresistenz im Allgemeinen § 478. Für die Protamine (Clupein) kann man mit großer Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein von Arginin-anhydriden überhaupt ausschließen, besonders weil sie keine Autoracemisation zeigen (BERGMANN, § 477). Indessen ist auch

---

207) ***M. Bergmann, L. Zervas, J. S. Fruton,*** Spec. of papain. Jl. of Biol. Chem., **111**, 225, 245 (1935). — 207a) ***M. Bergmann, W. F. Ross,*** Prot. Enz. of papain. ibid. 111, 659 (1935). — 208) ***Sh. Masui,*** Wirk. proteol. F. auf Methylencasein. Act. Schol. Med. Kyoto, **13**, 354 (1931). — 209) ***E. Waldschmidt-Leitz, G. v. Schuckmann,*** Struktur tier. Skelettsubst. Ber. Chem. Ges., **62**, 1891 (1929). — 210) ***D. R. Goddard, L. Michaelis,*** Study on keratin. Jl. of Biol. Chem., **106**, 605 (1934); **112**, 361 (1935). S.A.

damit nicht viel anzufangen, da ja die Protamine gegen das Prototyp der Proteinasen, gegen Pepsin resistent sind, trotz ihrer stark basischen Natur.

§ 476a. **Die Kettenglieder selbst.** Wir gehen also von der Grundanschauung aus, daß die Proteine in der Hauptsache aus aneinander gereihten Peptiden bestehen, so daß man hier zwei Grundelemente zu unterscheiden hat. Erstens die glatt in einer Linie in bestimmter räumlicher Lagerung (s. u.) verlaufende Kette R—CO—NH—R_1—CO—NH—etc., die Hauptvalenzkette. An dieser sitzen die sog. Seitenketten, bestimmt durch die dem „R" resp. „R_1" entsprechenden Radikale. Diese sind beim Glycin überhaupt nicht vorhanden; bei den einfachen Aminosäuren apolare Gruppen wie CH_3, C_4H_9, C_6H_5. Dazu kommen aber weiterhin polare Gruppen in den Seitenketten, nämlich 1) positiv geladene Gruppen: freie Aminogruppen am Lysin, Guanidogruppen am Arginin und noch reaktionsfähiges Ring-N; 2) negativ geladene Gruppen wie freies COOH an den Dicarbonsäuren und Oxyphenylgruppen am Tyrosin. Wir können mit Sicherheit aussagen, daß diese Seitenketten zum mindesten ganz überwiegend insofern „frei" sind als an den zweiten polaren Gruppen keine weiteren Peptidbindungen ansetzen; daß mit anderen Worten die Hauptvalenzkette nicht verzweigt ist. Dafür sprechen neben rein chemisch-analytischen Befunden (Lit. bei LINDERSTRØM-LANG, l. c. 197, s. a. u.) die Befunde, daß alle künstlich hergestellten Polypeptide, die β-Asparagyl oder γ-Glutaminyl enthalten, (dafür als Beispiel Glutathion) an dieser Peptidbindung unspaltbar sind (l. c. 145, 199, 201); solche Peptide können also im Proteinmolekül nicht vorkommen. Bei ϵ-Lysyl-peptiden liegt es nach ABDERHALDEN **210a)** ebenso. Diese Seitenketten sind in doppelter Hinsicht für die moderne Betrachtung sehr wichtig: einerseits für die räumliche Anordnung, da der Abstand zwischen den Hauptvalenzketten durch ihre Anordnung in beiden Richtungen bestimmt wird, und zweitens, weil nach der besonders von WALDSCHMIDT-LEITZ vertretenen Theorie diese freien polaren Seitenketten der Angriffspunkt für je nachdem Pepsin oder Tryptasen sind (§ 479a).

Nach Annahme dieser Grundanschauung steht eigentlich nur noch zur Diskussion, ob die C—N-Bindungen sämtlich die normale Form der Keto-Amid-Bindung —CO—NH— haben, oder ob irgendwelche Verschiebungen in diesen Bindungen schon im genuinen Protein vorliegen, die den Unterschied des Verhaltens genuiner Proteine gegenüber den Peptiden erklären könnten. An sich sind solche Vorstellungen durchaus naheliegend, da wir ja auch sonst sehr häufig mit desmotropen Formen solcher Bindungen zu tun haben, besonders mit der Enolbindung —C(OH)=N—. Aber bisher können wir nicht einmal sagen, ob solche Bindungen zur Ausbildung associativer Nebenvalenzbindungen zwischen den Ketten führen würden, also zur sozusagen Micellbildung, oder ob sie nicht umgekehrt die Haftfestigkeit der Kettenglieder herabsetzen würden, mit anderen Worten, ob man nicht viel eher annehmen sollte, daß ganz grundsätzlich — auch schon in den niederen Peptiden — eine Umlagerung der genuinen Keto-Amid-Bindung in eine Enolform den Abbau der Ketten einleitet.

Es läßt sich dazu nur Weniges aussagen. FODOR **211)** (l. c. 142) kommt aus seinen Abbauversuchen mit anhydrischer Spaltung (Glycerol, Acetanhydrid) zu der Ansicht, daß im Protein neben der normalen Kettenbindung einerseits, der rein intermolekularen Bindung durch VAN DER WAALS'sche Kräfte andererseits noch Nebenvalenzbindungen an Enolen gegeben sind,

---

210a) ***E. Abderhalden, F. Schweitzer,*** Verh. der Polypeptide etc. Fermentforsch., **12,** 350 (1931). S.A. — 211) ***A. Fodor,*** Chem. Struktur einiger Proteine. Bioch. Zs., **240,** 140 (1931).

von der Form —C(OH)—N—, die also die Ketten verknüpfen könnten. Dies gilt principiell, wenn FODOR auch sich noch immer der Theorie der kurzen Ketten zuneigt.

Aus ganz anderen Erwägungen kam GOLDSCHMIDT 212) zu der Ansicht, daß in den Proteinen keine normalen Peptidbindungen vorliegen; aber hier liegt der eben erwähnte Fall vor, daß diese Versuche unter ganz anderen Voraussetzungen, nämlich unter dem Gesichtspunkt der Dioxopiperazine als Grundkörper (oder zum mindesten als mitbeteiligte Grundkörper) vorgenommen worden sind. Es sei also nur referirt, daß nach GOLDSCHMIDT die normale Peptidbindung (in definirten Polypeptiden) resistent ist gegen Hypobromit bei 0°, während die Dioxopiperazine sich beim Abbau völlig analog den Proteinen selbst verhalten. Für diese konnte GOLDSCHMIDT bestimmte Kurven festlegen, für jedes Protein ist der zeitliche Verbrauch von Hypobromit eine ziemlich konstante Größe. Vielleicht kann man einmal diese Beobachtungen mit der Theorie der Dioxopiperazine am Kettenende (s.o.) in Einklang bringen. Die Ketopiperazine werden in neutraler Lösung nicht, wohl aber in alkalischer Lösung aufgespalten und in die um 1 C ärmeren Carbonsäuren übergeführt. Polypeptide aber werden nur an der freien NH_2-Gruppe angegriffen (wenn diese acylirt ist, garnicht) und in Nitrile übergeführt. Beim Abbau von Albumin aus Hühnerei konnten sowohl Carbonsäuren wie Nitrile isolirt werden; es scheinen danach sowohl freie NH_2-Gruppen wie Piperazinringe abgebaut zu werden.

Auf die Ausbildung von Scheinringen (Nebenvalenzringen) in Form von Dioxopiperazinen durch polare Bindungen innerhalb der Ketten selbst nach ASTBURY kommen wir unten zurück. Umgekehrt kommt BERGMANN 213) (l. c. 195/6) im Einverständnis mit z.B. LEVENE 214) zu der Überzeugung, daß in den Proteinen wie in den Peptiden die Keto-Amidgruppe —CO—NH— unbedingt erhalten sein muß, um den Enzymen jeglicher Art überhaupt eine Anheftungsstelle zu bieten. Der „Peptidwasserstoff" muß erhalten geblieben sein, sonst finden die Enzyme keine Wirkungsmöglichkeit. Wo dieses H substituirt ist, sind die Peptide resistent.

Die einzige Ausnahme für normale Proteasen sind die Prolin-peptide, bei denen das NH des Prolins in die Peptidbindung einbezogen ist, wie Glycyl-prolin. Diese werden durch ein Enzym (Prolin-peptidase) gespalten, das mit der Aminopolypeptidase einhergeht und vielleicht (was GRASSMANN, l. c. 2, bezweifelt) mit ihr identisch ist (213). Dehydrirte Polypeptide, wie Glycyl-dehydrophenylalanin, bei denen auch der Peptidwasserstoff fehlt, werden nach BERGMANN 215) nur durch ein Specialferment der Niere gespalten.

BERGMANN nimmt also an, daß der erste Akt der Enzymwirkung gerade eben die Enolisirung zur Imid-form —C(OH)=N— ist und hat bestimmte Schemata für die Verschiebung der Valenzen im Peptid als Vorbereitung des Zerfalls entworfen ((216), 217), l. c. 196), auf die wir § 480 zurückkommen.

Diese Erörterung scheint sich nur auf die enzymatische Spaltung zu beziehen. Denn z.B. BERGMANN selbst 218) hat gezeigt, daß bei der Alkalispaltung gerade die Ausschaltung der Enolisirung infolge von Acetylirung am NH die Labilität stark erhöht. Auf Grund spektroskopischer Messungen kommt GRÓH 219) zu der Annahme, daß im genuinen Caseinogen nur CO-NH-Gruppen vorhanden sind. Es zeigte sich bei alkalischer Hydrolyse eine wesentliche Verstärkung der Absorptionsbande bei 2900 Å, die er auf die nachträgliche Enolisirung zurückführt. Zu demselben Schluß kommt für Kollagen GAWRILOW 220). Bei der Einwirkung von Tryptase verschiebt sich der

---

212) ***St. Goldschmidt, Ch. Steigerwald,*** Abbau von Proteinen durch Hypobromit. Ber. Chem. Ges., **58**, 1346 (1925); ***St. Goldschmidt c.s.,*** Proteine IV. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **456**, 1 (1927). — 213) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich, F. Leinert,*** Proteol. F., Verh. von Prolinpept. Zs. phys. Chem., **212**, 71 (1932). S.A. — 214) ***P. A. Levene, H. Simms,*** The rel. of the chem. struct. to the rate of hydrol. of pept. Jl. of Biol. Chem., **62**, 711, **70**, 253 (1925/6). — 215) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Enz. Spalt. dehydrirter Peptide. Zs. phys. Chem., **205**, 65, **207**, 235 (1932). S.A. — 216) ***M. Bergmann, L. Zervas,*** Wirkungsweise etc. von Dipeptidase. Zs. phys. Chem., **224**, 11 (1934). S.A. — 217) ***M. Bergmann, L. Zervas c.s.,*** Spec. of dipeptidase. Jl. of Biol. Chem., **109**, 325 (1935). — 218) ***M. Bergmann,*** Enz. der Gerbereichemie (Vortrag). Collegium **1930**, 516. S.A. — 219) ***J. Gróh, M. Hanák,*** Spektr. Unt. über die Aldehydbind. der Eiweißk. etc. Zs. phys. Chem., **190**, 169 (1930). — 220) ***N. J. Gawrilow, A. Simskaja,*** Verschieb. des isoel. P. von Kollagen nach Einwirk. von Trypsin. Bioch. Zs., **238**, 44 (1931).

isoelektrische Punkt nach ph = 3,4. Dies führt GAWRILOW auf die Enolisirung der CO-NH-Bindung zurück. Sie erfolgt bei dem gleichen ph auch ohne Trypsin, aber viel langsamer, wird also im Sinne BERGMANN's durch die Anlagerung des Enzyms stark beschleunigt.

Strukturelle Querverbindungen zwischen den Ketten. Eine weitere Frage, die immer wiederkehrt und bisher nicht allgemein beantwortet werden kann, ist die, ob die Ausbildung mehrdimensionaler „Bündel" oder zweidimensionaler „Blättchen" ausschließlich auf associativen Bindungen ausgehend von Nebenvalenzkräften an den Peptidgruppen beruht, oder ob richtige strukturelle atomistische Brücken vorhanden sind. Grundsätzlich sind solche Möglichkeiten beschränkt, die Hauptsache bleiben immer die reinen langen Peptidketten, wie neuerdings wieder röntgenographisch (s.a. K. H. MEYER **221)**) auch für die Keratine — bei denen an sich diese Querverbindungen sichergestellt sind — von ASTBURY **222), 223)** gezeigt worden ist. Immerhin müssen sie mit in Betracht gezogen werden; und dafür bieten sich drei Möglichkeiten.

Die eine ist die z. B. von KARRER angeregte, daß sich an Oxygruppen echte **Aetherbindungen** ausbilden. Das einzige, was dafür spricht, ist die Tatsache, daß die Oxy-aminosäuren eine viel größere Rolle im Aufbau der Proteine spielen, als man früher wußte; außer den längst bekannten Tyrosin und Serin sind ja inzwischen noch Oxyprolin, Oxyglutaminsäure u.a. aufgefunden worden. Aber irgend eine experimentelle Stütze für die Existenz solcher Aetherbindungen konnte bisher nicht erbracht werden. In einem Fall, nämlich bei den Phosphoproteinen sind die Oxygruppen des Serins (alle oder die meisten) in ganz anderer Weise in Anspruch genommen. Sie sind an Phosphorsäure verestert, und zwar tritt die gesamte PhS als Serin-PhS auf. Das eigenartige Verhalten der PhS im genuinen Caseinogen und den Pepsinpeptonen einerseits, den tryptischen Abbauprodukten (Phosphopeptonen) andererseits (§ 477a) gegen Phosphatasen läßt darauf schließen, daß hier eine PhS mehrfach an Oxygruppen gebunden ist, und so tritt die Möglichkeit ins Licht, daß auf diese Weise eine echte hauptvalenzmäßige Querverbindung zwischen den Ketten tatsächlich an den Oxygruppen besteht, aber eben nicht als Aether, sondern als Ester.

Die zweite Möglichkeit ist die Ausbildung von **Disulfidgruppen** an den Thiolen. Sie sind von MICHAELIS (l. c. 210) chemisch und ASTBURY **222)** (röntgenographisch) für Keratin wahrscheinlich gemacht worden, und BERSIN **224)** nimmt sie auch für das Globulin an, das mit der Urease verbunden oder die Urease selbst ist. Denn dieses Protein enthält nach SUMNER 6 mal so viel Schwefel als S—H-Gruppen. Es ist durchaus nicht unwahrscheinlich, daß diese Zwischenbindung auch bei vielen anderen Proteinen vorkommt, — aber allein kann sie die enzymtypischen Besonderheiten auch nicht erklären, denn Kollagen mit seiner ausgesprochenen Resistenz enthält überhaupt kein Cystin.

Die dritte Möglichkeit endlich ist die Querverbindung durch Carbonyl, also das Auftreten der Uraminosäuren, deren Existenz aber überhaupt noch nicht gesichert ist. BRIGL **225)** hat die alte Annahme wieder aufgenommen, da er bei allen Proteinen mehr O als N findet, und nach einer weiteren Möglichkeit dafür sucht. So kommt er dann eben darauf zurück, daß die Ketten am Amino-Ende durch CO verbunden sind: $OC\!<\!\begin{matrix}NH\cdot CHR\cdot CO-NH\cdot CHR\ldots\\ NH\cdot CHR\cdot CO-NH\cdot CHR\ldots\end{matrix}$ (Er denkt auch an eine Veresterung der Carboxyle durch mehrwertige Alkohole, doch ist das ohne jede Stütze). Diese Ureidobindung soll wie die in den Proteinen durch Hypobromit ange-

---

221) ***K. H. Meyer***, Feinbau, Festigkeit und Kontraktil. tier. Gewebe. Bioch. Zs., **214**, 253 (1929). — 222) ***W. T. Astbury, A. Street***, X-Ray stud. of the struct. of hair etc. Phil. Trans. Roy. Soc., **A 230**, 75 (1931). — 223) ***W. T. Astbury***, X-Ray anal. of the struct. of animal. hairs and other protein fibres. Trans. Faraday Soc., **29**, 193 (1933); X-Ray stud. of protein struct. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol., **2**, 15 (1934). S.A. — 224) ***Th. Bersin***, Thiolverbind. und Enzyme. Erg. Enzymf. IV, 68 (87) (1935). — 225) ***P. Brigl, R. Held***, Konst. der Eiweißk. Zs. phys. Chem., **152**, 230 (1926).

griffen werden, die echte Peptidbindung bekanntlich nicht. GOLDSCHMIDT 226) hat gegen diese Angabe zuerst Widerspruch erhoben, dann aber zugestimmt: Carbonyl-diglycyl-glycin wird tatsächlich von NaOBr gespalten. Damit ist aber nur die Möglichkeit zugegeben, das tatsächliche Vorkommen nicht erwiesen; den überschießenden Sauerstoff kann man ebensogut auf einen Überschuß bisher nicht sichergestellter Oxysäuren beziehen.

Die Möglichkeit, daß sich auch in der Kettenmitte Querbindungen unter Benutzung der überständigen Aminogruppen des Lysins resp. Arginins, oder heterocyclischen N aus etwa Imidazolen einerseits, und Carboxylen der Dicarbonsäuren andererseits hauptvalenzmäßig, etwa in **Amidbindung**, ausbilden könnten, kann man ziemlich sicher ausschließen; denn alle diese Gruppen sind frei, wie wir bereits oben besprochen haben. Daß die ε-Aminogruppe des Lysins frei ist, ebenso das NH des Imidazolkerns etc. geht aus älteren und neueren Arbeiten hervor (Lit. z. B. bei LINDERSTRØM-LANG, l. c. 197). Ebenso sind alle Carboxyle der Aminodicarbonsäuren frei, wie aus Titrationskurven hervorgeht (z.B. E. COHN **226a**)), oder in bekannter Weise als Säureamide (Asparagin, Glutamin) gebunden (§ 468).

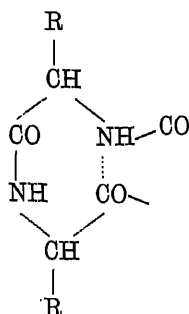
Schließlich muß noch an die Möglichkeit einfacher **Salzbindungen**, d. h. also polarer Bindungen zwischen freien Carboxylen der Dicarbonsäuren und freien Aminogruppen des Lysins und Arginins gedacht werden; solche Bindungen sind für das Keratin anzunehmen (§ 477); möglich sind solche Bindungen natürlich überall; welche Rolle sie generell spielen, völlig unbekannt; bei den Keratinen sollen sie — neben den S—S-Bindungen — gerade das besondere Verhalten, speciell die Enzymresistenz, erklären. Die Möglichkeit, daß solche polaren Bindungen zwischen überschießendem $[NH_3 \ldots]^+$ und $[\ldots COO]^-$ in den Proteinen außer den Skleroproteinen eine erhebliche Rolle spielen, ist aber auch rein chemisch beschränkt dadurch, daß solche bindungsfähigen Gruppen auch in dieser Weise kaum ausgenutzt sein können, da, wie oben erwähnt, die Carboxyle der Dicarbonsäuren beinahe sämtlich entweder frei oder in bekannter anderer Weise als Amide gebunden sind.

Die Konfiguration der Ketten. Wenn man also, wie dies unserer ganzen Darstellung zu Grunde liegt, die Proteine rein strukturell als lange Hauptvalenzketten ansieht, die mit anderen solchen Ketten zusammengebündelt sind, dann ist der einfachste Fall, daß alle Ketten gleiche Struktur haben, also nur eine Hauptvalenzkette existirt, wie dies für einige hochgereinigte und somit anscheinend einheitliche Proteine, wie Ovalbumin angenommen wird (SØRENSEN **227**), SVEDBERG **228**), ASTBURY **223**)). Dann verlaufen diese Ketten an sich schon, soweit röntgenographische Beobachtungen Schlüsse zulassen, nicht einfach geradlinig, sondern im Zickzack. Da nun aber an vielen Stellen starke polare Gruppen in den Ketten vorhanden sind, so üben diese nicht nur auf die entsprechenden entgegengesetzt geladenen Gruppen der Nachbarkette Nebenvalenz-Kräfte aus, die zur Association führen, sondern auch innerhalb derselben Kette.

Dadurch entstehen weitere Verzerrungen, die verschieden stark sein können, und u.U. bis zu einer Zusammenrollung der Ketten führen können, indem z.B. die CO-Gruppe einer Peptidbindung sich dem NH der Nachbarbindung so stark nähert, daß geradezu Gebilde entstehen, die konfigurativ an Dioxo-piperazine erinnern; nur daß eben hier der „Ringschluß" nicht durch eine Hauptvalenz, sondern eine Nebenvalenz erfolgt, in etwa der gleichen Art wie bei den von PFEIFFER genauer untersuchten organischen Nebenvalenzringen an Metallen. Schematisch ist das durch die nebenstehende Formel darzustellen (vgl. LINDERSTRØM-LANG, l. c. 197, S. 442). — Je stärker solche konfigurativen Verzerrungen zu associativen Bindungen führen, desto

---

226) ***St. Goldschmidt,*** Konst. der Proteine. Zs. phys. Chem., **165,** 149, **170,** 183 (1927). — 226a) ***E. J. Cohn,*** Physikal. Chem. der Eiweißk. Erg. Phys., **33,** 781 (1931). — 227) ***S. P. L. Sørensen,*** Konst. der lösl. Proteinstoffe als reversibel dissoc. Kompon.-Systeme. Kolloid-Zs., **53,** 102, 170, 306 (1930). — 228) ***The Svedberg,*** Ultrazentrif. Dispers.-Best. an Eiweißlösungen. Kolloid-Zs., **51,** 10 (1930).

```
      R
      |
      CH
    /    \
  CO      NH—CO
  |        ⋮
  NH      CO—
    \    /
      CH
      |
      R
```

größer wird ceteris paribus die Enzymresistenz sein (ASTBURY); dies wird — neben der reinen Strukturbindung zwischen den Ketten — für Keratin discutirt, aber auch für das zwar nicht gegen Pepsin, aber gegen Trypsin resistente System in den Albuminen. Die starke Acidität ladet die hydrophilen Seitenketten auf und drängt so die Ketten auseinander, was die schwache Alkalinität bei Trypsin nicht vermag. Eine volle Resistenz wie beim Keratin scheint also nur bei Kombination von struktureller Querbindung und räumlicher Stabilisirung einzutreten. Ähnliche Probleme werden uns beim Verhältnis Kollagen zu Glutin entgegen treten, wo auch die räumliche Konfiguration des ersteren für seine Enzymresistenz entscheidend ist (§§ 477a, 478). Auch durch mechanische Wirkung („Streckung") können diese Einrollungen beseitigt oder vermindert werden, so beim Keratin, vgl. § 477a. Andererseits discutirt RIMINGTON **229)** generell die Möglichkeit, daß die Proteinketten an der Oberfläche des Enzym-katalysators deformirt werden könnten, sucht also in dieser Hinsicht Beziehungen zwischen dem räumlichen Bau und der Möglichkeit des enzymatischen Angriffs. Eine Verfolgung dieser an sich sehr interessanten Fragen würde eine Behandlung der ganzen Frage über die Micellbildung und ihre Beziehungen zum Kristalliten bedingen, was uns hier zu weit führte.

2) Besondere Strukturen einzelner Proteine.

§ 477. Ist so die Ausbeute über die allgemeine Struktur der Proteine, wie man leider feststellen muß, recht spärlich, so fallen einige weitere Schlaglichter darauf, wenn man die Erkenntnisse zusammenstellt, die über die Struktur einzelner Proteine gewonnen sind. Hier stößt man auf irgend welche Besonderheiten, die wieder gewisse, leider auch sehr beschränkte, Rückschlüsse auf das Allgemeine gestatten. Uns interessiren hier natürlich vor Allem die Fragen der absoluten oder auswählenden Enzymresistenz (§ 478) einzelner Proteine resp. Proteide resp. abnormes Verhalten gegen Enzyme beim Abbau. Aber diese rein enzymtypischen Fragen lassen sich auch hier nicht loslösen, so daß wir einen ganz kurzen und bewußt oberflächlichen Überblick über die Strukturforschungen im Allgemeinen geben wollen.

a) Die sog. einfachsten Proteine: Protamine und Histone.

Die Protamine sind nach ihrer geringen Molgröße und ihrem äußeren Verhalten (starke Basen, giftig) viel eher als Polypeptide wie als Proteine zu betrachten. Aber enzymtypisch sind sie den Proteinen näherstehend; eigentlich den Peptonen, aber diese sind ja enzymtypisch nicht zu definiren, in dieser Beziehung werden sie vorläufig als ein Gemisch von Proteinen und Polypeptiden angesehen. Über die meisten Protamine ist in Bezug auf ihre feinere Struktur noch nichts bekannt. KOSSEL **230)** hat sie vorläufig danach eingeteilt, ob sie nur eine basische Gruppe (Arginin) enthalten oder zwei (Arginin + Histidin) oder alle drei, als Mono-, Di- und Triprotamine. Genauer auf ihre Struktur untersucht sind nur Clupein und allenfalls Salmin, zwei von basischen Aminosäuren nur Arginin enthaltende Monoprotamine. In jedem Falle enthalten sie Mono- und Diaminosäuren im Verhältnis 1 : 2. Säurehydrolyse führt zu den Protonen; Clupeon besteht aus Tripeptiden Monoaminosäure-Arginin-Arginin (GOTO 1902). Genaue kritische Darstellung des enzymatischen Abbaus LINDERSTRØM-LANG (l. c. 197).

229) ***Cl. Rimington,*** Protein structure. Trans. Faraday Soc., **27**, 222 (1931). — 230) ***A. Kossel, E. Schenk,*** Basische Eiweißstoffe. Zs. phys. Chem., **178**, 278 (1928); ***A. Kossel,*** Protamine und Histone. Leipzig 1929.

Nach älteren Angaben von KOSSEL und den ersten orientirenden Untersuchungen von WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **231**), **232**) sind die Protamine wie die Peptone resistent gegen Pepsin und Papain einerseits, „Erepsin" andererseits, wirklich energisch gespalten werden sie nur von Trypsin-Kinase. Trypsin allein und Papain-HCN spalten zu etwa 1/3, Sturin wird von diesen nicht angegriffen. Nach der Wirkung von Trypsin-kinase wirkt dann auch Darmerepsin weiter spaltend. Hinter „Trypsin" wirkt auch Papain-HCN, dann Erepsin und dann noch Trypsin-kinase; ebenso auch hinter Papain-HCN noch „Trypsin", dann Trypsin-kinase und dann Erepsin. Papain-HCN und dann Erepsin führen nur zu ca. 2/3 Spaltung. Nach FELIX **233**) werden durch Trypsin-kinase Arginin : Monoaminosäuren im Verhältnis 2 : 1 abgespalten, und zwar die Hälfte des Gesamtarginins; Erepsin setzt nachher weitere Arginine frei. Berechnet man im Ganzen NH_2 : COOH, so bleibt ein COOH übrig. (Näh. § 478a).

Die scheinbar sehr unübersichtlichen Verhältnisse haben dadurch zu einem erheblichen Teil ihre Lösung gefunden, daß die sonderbare Wirkung des nicht aktivirten „Trypsins" nicht auf die Proteinase, sondern auf eine Carboxy-polypeptidase (**234**) zu beziehen ist, und zwar eine besondere „Arginin-carboxypolypeptidase", die WALDSCHMIDT-LEITZ **235**) nunmehr als Protaminase bezeichnet. Auf dies Enzym selbst, das specifisch eingestellt ist auf die freie COOH-Gruppe des Arginins in mittellangen Ketten (WEIL **235a**)), kommen wir bei den Carboxy-polypeptidasen zurück. Hier interessirt nur, daß dieses Enzym ausschließlich freies Arginin am Kettenende abspaltet, und zwar 1/5 des Gesamtgehaltes = 2 Moleküle. (Amino-polypeptidase wirkt nicht auf Protamine, ebensowenig wie Dipeptidase, wie GRASSMANN und WALDSCHMIDT-LEITZ mehrfach angegeben haben). Was dann zurückbleibt, sind also die immer noch auf Trypsin-kinase ansprechenden Strukturen des **Clupeans** resp. Salmans, die sich also vom Clupein resp. Salmin um je 2 Argininгruppen mit einem freien Carboxyl unterscheiden. Dieser enzymatischen Abspaltung zweier Arginine entspricht die von KOSSEL **236**) gezeigte Abspaltung eines Arginyl-arginins aus Clupein durch kalte konz. H_2SO_4. Die Endstellung eines Arginins wird ferner dadurch bewiesen, daß Arginase aus Clupein ein Arginin loslöst und zu Harnstoff spaltet (FELIX **237**)), (von WALDSCHMIDT-LEITZ **245a**) nicht bestätigt); und daß Benzoyl-acetyl-clupein bei der Hydrolyse 1 Mol. Ornithin liefert (**238**). Und zwar steht das Arginin am Carboxyl-ende, da auch Benzyliden-clupein, aber nicht Clupein-ester von Protaminase gespalten werden.

Damit ist das eine Ende der Protaminkette aufgeklärt. Weitere Aufschlüsse haben zunächst rein chemische Untersuchungen ergeben. Nach WALDSCHMIDT-LEITZ **235**) besteht das KOSSELsche Clupein aus mehreren Komponenten von etwa gleichem Bauplan, aber doch gewissen Verschiedenheiten. WALDSCHMIDT-LEITZ isolirte nach einer sehr schonenden Methode zu 60—70 % eine anscheinend einheitliche Fraktion mit dem Verhältnis Arginin : Monoaminosäuren = 2 : 1; Prolin bei Clupein 1/5, Salmin 3/7 des gesamten Mono-amino-N. Nach der Analyse und Molgewichts-bestimmung nimmt er an: Clupein 10 Arginin, 1 Prolin, 1 Alanin, 2 Serin, 1 Valin, für Salmin 14 Arginin, 3 Prolin, 3 Serin, 1 Valin. Molgewicht 2021 bezw. 2855. Dazu kommt nun aber noch 1 Oxyprolin (s. u.). Alle (oder die meisten) Arginine sind rein peptidmäßig gebunden als Arginin selbst, nicht als Anhydride vorhanden. Dies erschließt BERGMANN **239**) daraus, daß synthetische Anhydride mit Arginin (Phenyl-arginin-anhydrid)

231) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, W. Graßmann,*** Struktur des Clupeins. Zs. phys. Chem., **156**, 68 (1926). — 232) ***E. Waldschmidt-Leitz, Th. Kollmann,*** Enz. Spaltbark. der Protamine. Zs. phys. Chem., **166**, 262 (1927). — 233) ***K. Felix, K. Dirr (A. Lang),*** Clupein. Zs. phys. Chem., **184**, 111, **193**, 1 (1929/30). S.A. — 234) ***E. Waldschmidt- Leitz, A. Purr,*** Proteinase und Carboxypolyp. des Pankr. Ber. Chem. Ges., **62**, 2217 (1929). — 235) ***E. Waldschmidt-Leitz, F. Ziegler, A. Schäffner, L. Weil,*** Struktur der Protamine I. Zs. phys. Chem., **197**, 219 (1931). S.A. — 235a) ***L. Weil,*** Prepar. of ... pure proteinase and quant. determ. of ... protaminase. Jl. of Biol. Chem., **105**, 291 (1934). — 236) ***A. Kossel, W. Staudt,*** Argininpeptid aus Clupein. Zs. phys. Chem., **170**, 91 (1927). — 237) ***K. Felix, K. Dirr, A. Hoff,*** Clupein VI. Zs. phys. Chem., **212**, 50 (1932). — 238) ***K. Dirr, K. Felix,*** Clupein III. Zs. phys. Chem., **205**, 83 (1932). — 239) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Köster,*** Autoracem. argininhalt. Aminos.-anh. Ber. Chem. Ges., **62**, 1901 (1929). S.A. —

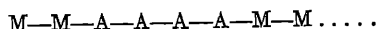
sich als freie Basen sehr schnell racemisiren, was die Peptide selbst nicht tun, und daß beim Clupein nur eine überaus langsame Auto-racemisirung erfolgt. Die Frage der Molgröße ist noch nicht restlos geklärt. WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 245a) hält nach seinen besprochenen Befunden das sozusagen einfache Molg. von 2021 für gesichert. Damit stimmt nun aber nicht, daß nach den freien Carboxylen ein doppeltes Molg. anzunehmen ist **(239a)**; es ist also eins zu wenig für die einfache Molgröße vorhanden. Da aber auch eine Aminogruppe fehlt (s. o.), so nimmt WALDSCHMIDT-LEITZ an, daß sich ein Associat von 2 Moll. ausbildet, in dem je ein NH_2 und ein COOH „maskirt" sind (l. c. 245a).

Salmin verhält sich ähnlich, auch hier spaltet Protaminase zwei endständige Arginine ab. Dagegen verhält sich Scombrin gegen die einzelnen Enzyme abweichend, und Sturin (ein Triprotamin) wird von Protaminasen nicht angegriffen; vielleicht fehlen hier die endständigen Arginine. Sturin ist nach LISSITZIN **240)** mit Husin und anderen Störprotaminen identisch; er schlägt für alle Störprotamine den gemeinsamen Namen **Acipenserin** vor.

Aus diesen Ergebnissen hatte WALDSCHMIDT-LEITZ den vorläufigen Schluß gezogen, daß Clupein am Amino-ende ein Prolin in der Bindung P—A—A—M—A—A . . . hat (P = Prolin, A = Arginin, M = Monoaminosäure). Zu anderen Schlüssen gelangten FELIX c.s., aber eben auch mit anderen Präparaten von Clupein, worüber Näh. l. c. 197 einzusehen ist. Insbesondere macht die Neuauffindung des Oxyprolins als Baustein große Schwierigkeiten, da sie in die WALDSCHMIDT-LEITZ'sche Formulirung garnicht paßt. Vielleicht gibt es Clupeine mit Oxyprolin anstelle des Valins (l. c. 197).

Nach DIRR und FELIX **241)** kommt Arginin im Clupein nur als Arginyl-arginin vor, in Tripeptiden mit den Monoaminosäuren wie bei GOTO. Aus der tryptischen Hydrolyse fanden sich **(242)** neben Arginyl-arginin noch verschiedene andere Dipeptide des Arginins mit Serin, Alanin, Valin und Oxyprolin (neu als Baustein gefunden). Es werden also die angenommenen Tripeptide bald zwischen den Argininen, bald zwischen Arginin und Mono-aminosäure gespalten. Weiterhin wurde ein Triarginyl-arginin und ein Triarginyl-valin isolirt **(243)** (Hydrolyse mit HCl). Prolinpeptide konnten nicht isolirt werden.

FELIX schließt daraus, daß die Kette aus 2 Protonen = Tripeptiden besteht und wie folgt anzuordnen ist:

M—M—A—A—A—A—M—M . . . . .

WALDSCHMIDT-LEITZ **244)** hat dann noch angegeben, daß kristallisirtes NORTHROP-Trypsin weiter abbauend auf Clupean einwirkt, als eine gereinigte Pankreasproteinase, das erstere also vielleicht ein weiteres Enzym enthalten könnte. Auf die Protamine selbst wirken beide gleich. Der Befund konnte nicht bestätigt werden **(244a)**.

In neueren Versuchen kommt nunmehr auch WALDSCHMIDT-LEITZ **245), 245a)** zu dem Ergebnis, daß kein endständiges Prolin vorhanden ist. Er unterwarf sein Clupean einer Hydrolyse mit vollkommen wirkungsreiner Tryptase. Dabei wurden 4 Peptidbindungen gelöst, es entstehen also 5 Bruchstücke. Davon sind drei Tripeptide und 2 Dipeptide, womit er sich also grundsätzlich den Befunden von FELIX nähert; indessen wurde in diesem Clupean wieder kein Oxyprolin gefunden. Die weitere enzymtypische Analyse mit Peptidasen und Arginase ergab folgende Struktur der 5 Peptide:

1) A M   2) M A   3) A M A   4) A M A   5) A P A

Unter willkürlicher Einsetzung von APA in die Reihe ergibt sich für Clupean die Struktur

---

239a) ***K. E. Rasmussen, K. Linderstrøm-Lang,*** Electrom. Titration von Clupein. Zs. phys. Chem., **227**, 181 (1934). — 240) ***M. A. Lissitzin c.s.,*** Chem. Zusammens. der Störprotamine. Zs. phys. Chem., **238**, 54 (1936). — 241) ***K. Dirr, K. Felix,*** Clupein IV. Zs. phys. Chem., **209**, 5 (1932). — 242) ***K. Felix, K. Inouye, K. Dirr,*** Clupein V. Zs. phys. Chem., **211**, 187 (1932). S.A. — 243) ***K. Felix, R. Hirohata, K. Dirr,*** Clupein VII. Zs. phys. Chem., **218**, 269 (1933). — 244) ***E. Waldschmidt-Leitz, S. Akabori,*** Enz. Komp. der Proteinase aus Pankr. Zs. phys. Chem., **228**, 224 (1934). — 244a) ***H. Holter, M. Kunitz, J. H. Northrop,*** Spalt. von Clupean d. versch. Trypsinpräp. Zs. phys. Chem., **235**, 19 (1935). S.A. — 245) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Struktur der einfachsten Eiweißk. Sitzb. Ak. Wien IIb, **144**, 489 (1935). — 245a) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Kofranyi,*** Strukturaufklär. des Protamins. Zs. phys. Chem., **236**, 181 (1935). S.A.

MAAMAAMAAPAAM, und somit für Clupein MAAMAAMAAPAAMAA. Die Existenz der FELIX'schen Triarginyl-peptide ist also mit dieser Formel unvereinbar; vielleicht hat dieser wirklich ein anderes Clupein untersucht. Dazu ist eine bei LINDERSTRØM-LANG (l. c. 197) wiedergegebene Angabe wichtig, daß nach neuen Versuchen von SØRENSEN alle bisher untersuchten Protamine bereits Abbauprodukte der genuinen Zellkernprotamine sind, sowie der Befund von RASMUSSEN **245b**), daß die von ihm isolirten Hauptfraktionen von Clupein nicht nur aus Clupeonen aufgebaut sein können, da sie mehr Arginin-N enthalten, als dem Verhältnis 2 : 1 für Arginin : Monoaminosäuren entspricht.

Es könnten also eventuell ganz verschiedene secundäre Ketten als „Clupein" zur Untersuchung kommen. Der wichtigste nunmehr einhellige Befund ist das **Auftreten von Dipeptiden** bei der Wirkung reiner Proteinase. Daraus zog bereits LINDERSTRØM-LANG (l. c. 197) den allgemein sehr wichtigen Schluß, daß Tryptase in der Mitte der Clupeinkette spaltet, indem sie 1—2 innere Bindungen löst, und zwar zwischen je 2 Argininen; und dieser Schluß ist nun durch die Befunde von W.-L. (**245a**)) direkt bestätigt, da alle Spaltungen so erfolgen, daß die Bindung zwischen 2 Argininen gelöst wird. Es ist noch zu ergänzen, daß das Chymotrypsin-NORTHROP nur 2 Bindungen, ebenfalls zwischen Argininen, löst, und ein Produkt bildet, das durch Tryptase noch spaltbar ist. Auf diese Fragen der Enzymwirkungen kommen wir §§ 478a, 479 zurück.

Über die **Histone** hier nur wenige Worte, da sie noch kaum näher bekannt sind. Nach WALDSCHMIDT-LEITZ **246**) sind die Histone grundsätzlich anders gebaut als die Protamine; dies geht ja schon daraus hervor, daß sie durch Pepsin zerlegt werden in Histopeptone. Wenn man erst Trypsin-kinase, dann Erepsin wirken läßt, so spaltet jedes Enzym etwa zur Hälfte auf. Zuerst ist NH_2 : COOH = 1 : 1, von der 2. Hälfte der Erepsinspaltung an überwiegt das Auftreten von COOH. Nach FELIX **247**) kann man bei Thymushiston die Abbauprodukte nach Pepsin in 5 Fraktionen zerlegen; bei der Pepsinwirkung werden Lysin und Arginin frei, während sonst nur eine geringe Zunahme von NH_2 und COOH erfolgt. Im Ganzen werden gleiche Mengen basischer und saurer Gruppen frei; auch FELIX fand ein Zurückbleiben der NH_2-Gruppen, wahrscheinlich handelt es sich um Guanidin-gruppen.

Eine weitere sehr genaue Untersuchung von WALDSCHMIDT-LEITZ **248**) ergibt für die Wirkungsgröße der einzelnen Enzyme einfache Zahlenrelationen. Bei der Pepsinspaltung entstehen gegenüber der Angabe von FELIX keine Dipeptide, da Hefedipeptidase nach Pepsin nicht wirkt, ebensowenig nach Papain. Papain wirkt nach Pepsin ebenfalls nicht, wohl aber Papain-HCN. Pepsin leistet 10 (d. h. %) und die anderen einfache Vielfache von 10, außer dem in der Wirkung zurückbleibenden Darm-erepsin (§ 478a).

Ein besonders gereinigtes Histon enthält nach FELIX **249**) als Mindestzahl 10 Arginin und 3 Histidin; 12 Carboxyle und 20 freie NH_2-Gruppen. Es enthält SH-gruppen. Die Mindestmol-größe gibt er (für das Hydrochlorid) mit 14160 an.

b) Seidenfibroine.

§ 477a. Diese Gruppe von Proteinen hat immer großes Interesse erweckt durch ihren besonderen und relativ einfachen Bau und ihre Resistenz gegen alle Proteasen. Sie enthalten keine Amino-dicarbonsäuren, kein Cystin, keine Heterocyclen,

---

245b) ***K. E. Rasmussen***, Darst. u. Frakt. von Clupein. Zs. phys. Chem., **224**, 97 (1934). — 246) ***E. Waldschmidt-Leitz***, Struktur der Proteine. Ber. Chem. Ges., **59**, 3000 (1926). — 247) ***K. Felix, A. Harteneck***, Aufbau des Histons der Thymusdrüse. Zs. phys. Chem., **146**, 103, **157**, 76, **165**, 103 (1925/7). — 248) ***E. Waldschmidt-Leitz, G. Künstner***, Pepsinwirk. Fract. enz. Hydrol. des Histons. Zs. phys. Chem., **171**, 70, 290 (1927). — 249) ***K. Felix, H. Rauch***, Aufbau des Histons der Thymusdrüse. Zs. phys. Chem., **200**, 27 (1931).

bestehen wahrscheinlich im reinsten Zustande nur aus Glycin, Alanin und Tyrosin, vielleicht Arginin und Serin. Trotz dieser schon stark vereinfachten Zusammensetzung besteht jedes Seidenfibroin noch aus mehreren Proteinen, die nichts miteinander zu tun haben.

Wegen dieser einfachen Struktur war das Seidenfibroin ein Hauptobjekt und eine Hauptstütze der Forschungen betr. die „kleinen Grundkörper", sowohl rein chemisch wie röntgenographisch. Chemisch nahm z. B. Lüdtke **250)** an, daß der Grundkörper ein Glycylalanin-anhydrid ist, das bei der sauren wie alkalischen Hydrolyse in Dipeptide, dann langsam weiter zu den Aminosäuren zerlegt wird. Als dann für die normalen, d. h. enzymempfindlichen Proteine diese Lehre versagte, bildete die Enzymresistenz des Seidenfibroins ein Argument dafür, daß eben vielleicht gerade bei solchen Proteinen die Theorie der Anhydrid-grundkörper richtig sein könnte. Abderhalden **251)** hielt sowohl das Fibroin selbst wie seine Peptone für Glycyl-alanin- und Glycyl-tyrosin-anhydride. Dies nahm auch Waldschmidt-Leitz **252)** zunächst als möglich an, fand aber später **(253)**, daß die durch vorsichtige Säurehydrolyse entstandenen Peptone — die nun trypsinspaltbar sind — höhere Polypeptide darstellen, womit auch hier die Theorie der kleinen Grundkörper aus dem Felde geschlagen war. So sei hier nur noch kurz erwähnt, daß auch an diesem Objekt die Ergebnisse mit der „Dispergirung" in die Irre geführt haben. Resorcin z. B. bewirkt im Gegensatz zur ersten Annahme von Herzog **254)** keine Zerteilung in Grundkörper, sondern einen hauptvalenzmäßigen Abbau (Dobry **255)**). Zu derselben Ansicht gelangt auf Grund ausgedehnter Untersuchungen Uchino **256)**. Er wendete die von Shibata wie von Ssadikow angegebenen Methoden der wasserfreien Spaltung (§ 474) an und erhielt verschiedene Anhydride, die er aber ausnahmslos für secundäre Bildungen aus Peptidketten hält.

Die **Röntgendiagramme** an diesem sehr einfachen Protein haben wertvolle Hinweise für das allgemeine Eiweißproblem ergeben. Nach Brill **257)** ist das übliche Seidenfibroin (von *Bombyx mori*) nicht einheitlich. Der eigentliche „Seidenkristall" hat einen Elementarkörper von 1 oder 2 Glycyl-alaninen (resp. Anhydriden), der Überschuß an Glycin und das Tyrosin kommen einem zweiten Protein zu. Dasselbe gilt für Spinnenseide (Herzog **258)**). Nach dem Diagramm hielten Brill und Herzog diese Elementarkörper für auch chemisch selbstständig und somit für Anhydride, ohne sie mit den von Abderhalden **251)** angenommenen zu identifiziren **(259)**. Diese Theorie wurde von Meyer und Mark **260)** mit denselben Argumenten wie überall durch die der durchgehenden Kettenbausteine ersetzt.

Ein Alanyl-glycyl- (oder Glycyl-alanyl-)Rest ist 7 Å lang, damit stimmt die Identitätsperiode in der Faserachse. Die Dynaden sind entweder $(\text{Glycyl-alanin})_2$ oder $(\text{Glycyl-alanin})_4$. Die mittlere Länge der Hauptvalenzketten ist 150 Å, entsprechend einem Polypeptid von mindestens 20 Glycylalanin-resten. Der Abstand der Ketten von einander ist = ca. 5 Å; die Ketten sind durch starke Associationskräfte ausgehend von der Amidgruppe aneinander gebunden. Neben den Kristallen sind in der Seidenfaser noch 40—60 % amorphe Substanz vorhanden (Rinden- und Kittsubstanz). Auch Astbury (l. c. 223) fand für die Kettenabstände 4,4 bezw. 4,8 Å, dieser geringe Zwischenraum beruht darauf, daß hier die kurzen und nicht polaren Seitenketten ganz (Glycin) oder fast ganz in die eigentliche Kette einbezogen sind und kaum herausragen, während sie bei anderen Proteinen

250) ***M. Lüdtke***, Proteinstudien IV. Zs. phys. Chem., **141**, 100 (1924). — 251) ***E. Abderhalden, E. Schnitzler***, Struktur des Seidenfibroins. Zs. phys. Chem., **164**, 159 (1927). — 252) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner***, Bedeut. der Diketopiper. etc. Ber. Chem. Ges., **58**, 1356 (1925). — 253) ***E. Waldschmidt-Leitz, G. v. Schuckmann***, Struktur tier. Skelettsubst. Ber. Chem. Ges., **62**, 1891 (1929). — 254) ***R. O. Herzog***, Skleroproteine. Helv. Chim. Acta, **11**, 529 (1928). — 255) ***A. Dobry***, Einw. von Resorcin auf Seidenfibroin. Diss. (bei Herzog) Berlin 1931; BPh **64**, 436. — 256) ***T. Uchino***, Part. Abbau des Seidenfibroins. Jl. of Biochem., **20**, 65 (1934). — 257) ***R. Brill***, Seidenfibroin. Ann. Chem. Pharm. (Liebig), **484**, 204 (1923). — 258) ***R. O. Herzog, W. Jancke***, Röntg. Unt. von Spinnenseide. Zs. phys. Chem., **164**, 306 (1927). — 259) ***R. O. Herzog***, Struktur des Seidenfibroins. Zs. phys. Chem., **166**, 160 (1927). — 260) ***K. H. Meyer, H. Mark***, Aufbau des Seidenfibroins. Ber. Chem. Ges., **61**, 1932 (1928); ***K. H. Meyer***, Chemie der Micelle etc. Bioch. Zs., **208**, 1 (1929); ***K. H. Meyer***, Feinbau, Festigkeit und Kontraktilität tier. Gewebe. Bioch. Zs., **214**, 253 (1929).

(Gelatine) in einer Richtung herausragen, so daß hier die Kettenabstände in dieser Richtung viel größer sind (10 Å), während die aufeinander gepackten Ketten wieder nur ca. 4,5 Å von einander entfernt sind. Dies wird von LLOYD 261) bestätigt, der die Quellung durch Wasser, Alkali und Säure röntgenographisch verfolgte. Bei dieser findet ein Auseinanderdrängen der parallel liegenden, durch Restvalenzen der Carboxyl- und Imino-gruppen in „Fibern" aneinander gebundenen Ketten zu dünnen „Fibrillen" statt.

Die Seidenfibroine tragen also keine essentiellen Besonderheiten im Aufbau, sondern sind in Bezug auf die Kettenstruktur nicht anders zu betrachten als andere Proteine auch; dies wird auch durch die Röntgendiagramme bestätigt. Ihre Enzymresistenz kann also nicht auf solchen Besonderheiten beruhen, sondern bedarf einer anderen Erklärung, die wir heute noch nicht geben können. Daß WALDSCHMIDT-LEITZ hier wie beim Keratin an eine besondere Struktur der Kettenenden denkt, nämlich an eine anhydrische Bindung in langgestreckten Ringen von einem Kettenende zum anderen, haben wir § 476 berichtet.

Im übrigen ist die Frage der Fermentresistenz noch durchaus nicht geklärt und hängt damit zusammen, daß „Seidenfibroin" eben auch noch kein einheitlicher Begriff ist, wie dies ja auch die Röntgenanalyse ergibt. Es gibt einen Anteil des Seidenfibroins — natürlich nach Entfernung des Sericins —, der unter gewissen Umständen durch Proteinasen angreifbar ist. ABDERHALDEN (l. c. 160, II) fand in Wasser aufgeschwemmtes Seidenfibroin sowohl durch Pepsin wie durch „Trypsin" angreifbar; im letzteren Falle schied sich Tyrosin ab. Trypsin und dann Erepsin bauen zu 50 % zu dialysirbaren Produkten ab. Es ist nun noch nicht geklärt, ob dieser Anteil sich chemisch differenziren läßt, ob mit anderen Worten der amorphe Anteil, der Tyrosin, Prolin und Serin enthält, auch der enzymatisch spaltbare ist im Gegensatz zum Seidenkristall, oder ob hier kolloidchemische Argumente wichtiger sind, etwa eine besonders starke Association, die wie bei der Cellulose zur relativen Resistenz führt, und wie man es beim Kollagen diskutirt. Dafür spricht eine Angabe von HARRIS 262), daß kolloidal gelöstes Fibroin von Trypsin angegriffen wird, und die ungefähr (nach einem kurzen Referat zu schließen) von MÜNCH 263) bestätigt wird. Er fand das Fibroin im Seidenfaden unangreifbar; wohl aber wird der kolloidale Drüseninhalt von *Bombyx mori* durch Papain-HCN total gespalten, ebenso auch die Drüsen selbst (nach Entfernung des Sericins durch Alkali). Es ist dann durchaus möglich, daß die Fermentresistenz der eigentlichen Kette des Seidenkristalls rein chemisch durch die einförmige lange Kette von Mono-aminosäuren mit apolaren Seitenketten bedingt ist (vgl. § 479).

Andererseits spricht für eine rein chemische Differenzirung die Tatsache, daß GOLDSCHMIDT 264) entsprechend den Röntgen-befunden auch zwei gegen Hypobromit ganz verschiedene Anteile fand. Durch Hypobromit zerfällt der Faden in kristallartige Blättchen, die bei der Hydrolyse nur Alanin und Glycin liefern; sie haben ein Molgewicht von ca. 4000. Sie sind röntgenographisch identisch mit dem „Seidenkristall". Dieses gegen NaOBr resistente Abbauprodukt wird immer weniger, je länger das Hypobromit wirkt, d. h. es wird schließlich auch das eigentliche Seidenfibroin angegriffen; nach 16 Min. besteht es aber auch schon nur noch aus 32,6 % Glycin und 67,3 % Alanin. Konzentrirte HCl wirkt ähnlich, aber das Tyrosin bleibt erhalten. Diese Kettenreste sind durch Trypsin spaltbar, unter Abscheidung von Tyrosin. Der Tyrosingehalt ist gering, nur etwa $^1/_{13}$ des Alanins. GOLDSCHMIDT schließt daraus, daß im Seidenfibroin jede einzelne Kette stets nur aus einer Aminosäure aufgebaut ist, aber erst verschiedenartige zusammengelagerte Ketten den Kristall aufbauen, daß man also mit dem einfachsten Schema der Glycin-alanin-Ketten nicht auskommt. Der Identitätsabstand beträgt stets 7 Å. Das Seidenfibroin ist also schon an sich, im Kristall, wesentlich

261) ***D. J. Lloyd, R. H. Marriott,*** The swelling of prot. fibres II. Silk gut. Trans. Faraday Soc., **29,** 1228 (1933). S.A. — 262) ***A. Harris, T. B. Johnson,*** Study of silk protein etc. Ind. Eng. Chem., **22,** 965 (1930). — 263) ***H. Münch,*** Struktur des Seidenfibroins (Vortrag-Ref.). Chem. Ztg., **59,** 571 (1935). — 264) ***St. Goldschmidt c.s.,*** Seidenfibroin. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **480,** 263 (1930), **505,** 255, 262 (1933).

komplicirter gebaut, als man annahm, und ist wohl auch in dieser Hinsicht als Modell für die noch viel komplicirteren sonstigen Proteine anzusehen. Wahrscheinlich enthalten auch diese Proteine Ketten von immer nur wenigen Aminosäuren in unendlich wechselnder Verknüpfung. UCHINO (l. c. 256) weist darauf hin, daß Tyrosin immer nur mit Glycin verbunden beim Abbau auftritt, niemals direkt an Alanin gebunden. Es handelt sich also anscheinend um Alanin-glycin-ketten mit je einem Tyrosin am Ende. GRANT **265)** fand bei Hydrolyse mit 70 %iger H_2SO_4 mehrere Peptone mit sehr verschiedener Zusammensetzung und wechselndem Tyrosingehalt. Nun kommt also noch die amorphe Bindemasse hinzu, in der nach GOLDSCHMIDT die Kristalle in keilförmigen Strängen eingelagert sind. Man kann nicht aussagen, ob diese dieselbe chemische Natur, nur in ungeordneten Ketten, haben, oder ganz andere Proteine sind.

ABDERHALDEN **266)** hat sich vergeblich bemüht, die anscheinend vorhandenen verschiedenen Anteile zu trennen. Versuche mit 50 %iger LiBr-Lösung führten zu einer Dispergirung; aus der kolloiden Lösung konnte mit Brom ein Produkt gefällt werden, das Glykokoll, Alanin, Serin und 2,5-Dibromtyrosin enthielt, sodaß ABDERHALDEN annimmt, daß das gesamte Fibroin in Gestalt seiner Br-Verbindung zur Abscheidung gelangte, während der in der Lösung verbliebene Teil noch restlichen Seidenleim darstellen sollte. Das gleiche Ergebnis hatten Dialyseversuche **(267)**. Auch die Benzoylirung führt nicht zu deutlichen Fraktionen. Der Tyrosingehalt wird zu 10 %, der des Serins zu 5 % angenommen, deren OH-Gruppen im genuinen Seidenfibroin frei vorhanden sind, sodaß also die OH-Gruppen nicht an der Verkettung teilnehmen. Ob freie NH_2-Gruppen vorkommen, läßt sich jedoch aus den angestellten Versuchen nicht einwandfrei festlegen **(267)**. Schließlich ist es ABDERHALDEN gelungen, Tetra- und Pentapeptide mit Prolin, Serin und Tyrosin zu isoliren (l. c. 140); ob diese aus dem Kristall oder der Kittsubstanz stammen, ist nicht bekannt; nach den Ergebnissen von GOLDSCHMIDT könnte man eher das letztere annehmen.

c) Sonstige Skleroproteine.

Von den Gerüsteiweißen haben in Bezug auf Strukturprobleme in neuerer Zeit besonders zwei das Interesse erweckt: die Keratine wegen ihrer beinah absoluten Enzymresistenz und das Kollagen, letzteres besonders wegen seines praktisch so ungemein wichtigen Verhältnisses zum löslich gewordenen Glutin. Bei beiden, die ja auch in natürlichen Fasern auftreten, haben auch die Röntgendiagramme einige grundsätzliche Aufschlüsse gegeben.

Von den anderen wissen wir in Bezug auf ihre Bauplan-Unterschiede gegenüber den normalen Proteinen noch so gut wie nichts. Vom **Elastin** können wir mit einiger Sicherheit sagen, daß es wahrscheinlich in ähnlicher Art, wie man es beim Seidenfibroin annimmt, aus Ketten ganz verschiedener Zusammensetzung besteht; so hat z. B. BRIGL **268)** durch Abbau mit Phtalsäureanhydrid hochmolekulare Stoffe erhalten, die trotz des hohen Glycingehaltes (26 %) des Elastins frei von Glycin waren, — wenn man nicht diese Produkte als secundäre Reversionsprodukte betrachten will. Elastin hat nach HERZOG (l. c. 254) dasselbe Röntgen-Spektrum wie Kollagen.

Keratine. Hier liegen rein chemisch einige neue Gesichtspunkte zur Erkenntnis der Struktur vor*), und zwar sind es deren zwei: die Bindung salzartiger Natur zwischen den Ketten durch Reaktion zwischen freiem NH_2 und freiem COOH, und die Bindung durch Disulfid-gruppen. Beide sind, wie SPEAKMAN **269)** angab, entscheidend für die Sonderstruktur und die Enzymresistenz der Keratine. ASTBURY (l. c. 223) denkt besonders an Bindungen zwischen Glutaminsäure und Arginin, und zwar nicht nur zwischen den Ketten, sondern auch zwischen den einzelnen Kettengliedern innerhalb derselben Kette.

*) Zusammenfassung bei MICHAELIS **269a)**.

265) ***R. L. Grant, H. R. Lewis,*** Partial hydrol. of silk fibroin. Jl. of Biol. Chem., **108,** 667 (1935). — 266) ***E. Abderhalden, H. Mahn,*** Struktur des Seidenfibroins. Zs. phys. Chem., **178,** 253 (1928). — 267) ***E. Abderhalden, H. Brockmann,*** Struktur des Seidenfibroins. Bioch. Zs., **211,** 395, **226,** 209 (1930). — 268) ***P. Brigl, E. Klenk,*** Phtals. -anh. als Spaltmittel von Eiweißkörpern. Zs. phys. Chem., **181,** 66 (1923). — 269) ***I. B. Speakman, M. C. Hirst,*** Const. of the keratin mol. Nature, **128,** 1073 (1931); ***I. B. Speakman, M. C. Hirst,*** Const. of keratin molecule. Trans. Faraday Soc., **29,** 148 (1933). — 269a) ***L. Michaelis,*** Keratin. Jl. Am. Leather Ass., **30,** 557 (1935). S.A.

Abgeschlossen: 20. 6. 36. Ber. Phys. 93, H. 1/2.

SPEAKMAN fand, daß Wollfasern in sauren Lösungen ihre Elastizität verlieren und leichter gestreckt werden können; dieser Vorgang ist reversibel, im Gegensatz zur Nitritwirkung, welche die Elastizität zerstört. Er schließt daraus, daß die freien Aminogruppen für die Elastizität dadurch verantwortlich zu machen sind, daß sie salzartig gebunden sind. Es sollen Carboxyle der Dicarbonsäuren mit freien NH_2-Gruppen des Lysins und Arginins gebunden sein. Dadurch wird die Drehung der Faserachse bei der Streckung der Wollfaser erschwert. In Wasser verlangt diese Arbeitsaufwand (3,86 × 10^7 erg je g); in saurer Lösung sind diese polaren Bindungen geöffnet und die Streckung erfolgt ohne Arbeitsaufwand. Wolle bindet soviel HCl wie dem berechneten freien NH_2 entspricht (80 ccm n-HCl je 100 g Wolle), wobei 1115 cal/g frei werden.

Neben diese polaren Bindungen tritt nun aber bei den Keratinen mit ihrem außerordentlich hohen Schwefelgehalt mit wahrscheinlich viel größerer Bedeutung die rein chemische Bindung durch —S—S-Gruppen. GODDARD und MICHAELIS **270)** haben, wie vor ihnen schon PULEWKA **271)**, SPEAKMAN **272)** und ASTBURY (l. c. 222), die altbekannte lösende Wirkung von Na_2S auf Keratine auf die Umwandlung der Disulfidgruppe bezogen, jedoch die Reaktion dahin erweitert, daß jede Reduktion der S—S-Gruppe bei alkalischer Reaktion das Keratin insofern tiefgreifend umwandelt, als es nunmehr löslich wird und dieses **Keratein** alle Eigenschaften eines echten Proteins zeigt; eine Hydrolyse der Ketten tritt dabei nicht ein. Als Reduktionsmittel eignen sich am besten KCN (ph = 12—13) oder Thioglycolsäure (ph = 10). Es wird dabei fast der gesamte Schwefel des Keratins zu SH reducirt; die SH-Gruppe gestattet verschiedene Substitutionen, z. B. mit Jodacetat zu Carboxy-methyl-keratein. Das Keratein ist leicht autoxydabel und auch durch K-Ferricyanid leicht zu oxydiren, indem die SH-Gruppen wieder in S—S-Gruppen übergehen (Metakeratin). Die Kerateine sind löslich in Alkali und Säure und durch Enzyme angreifbar, und zwar auch dann, wenn man sie wieder zu Metakeratinen oxydirt; sowohl durch Trypsin wie durch Pepsin. Aber diese wieder oxydirten Proteine zeigen nicht wieder die Kristallstruktur des genuinen Keratins; die Disulfidbindungen sind es also nicht allein, die den Bau des Keratins beherrschen. Es muß beides zusammentreffen, die polaren Bindungen und die S—S-Brücken. Erst muß das Alkali die polaren Bindungen lösen, und dann erst kann die Reduktion der S—S-Gruppen erfolgen.

Die **Röntgendiagramme** (ASTBURY, l. c. 223) zeigen folgendes Bild. Aus den Ketten ragen erheblich lange Seitenketten heraus, die einen Abstand in dieser Richtung („*side chain spacing*") von etwa 10 Å bewirken. Der („rückwärtige") Abstand der aufeinandergepackten Ketten („*back bone spacing*") tritt beim natürlichen Säugetier-keratin (α-Keratin) nicht hervor, sondern erst nach reversibler Dehnung um 100 %; dann erscheint er auch hier in der üblichen Größe von 4,65 Å (β-Keratin). Die Hauptketten sind also in dieser Ebene stark gefaltet. Die Verknüpfung der Ketten zum Kristall erfolgt nach ASTBURY **273)** entweder durch Verbindungsbildung (an den S—S-Brücken, s. o., oder auch durch echte Salzbildung **274)**) zwischen den Seitenketten („*side chain linkage*")), oder durch Nebenvalenzbindung zwischen den rechtwinklig zur Kette stehenden, in ihr peptidisch gebundenen — CO bezw. NH — an den einander gegenüberstehenden Kettenmitten („*back bone linkage*"). ASTBURY und SPEAKMAN **272, 273)**, entwickeln für die Struktur des orientirten bezw. desorientirten β-Keratins ein Bild, das der Auffassung von GERNGROSS über die Struktur der Gelatine (s. weiter u.) entspricht. Neben dem „grätenähnlichen" Kristallgefüge enthält das Micell des Keratins nach ASTBURY (l. c.

270) ***D. R. Goddard, L. Michaelis,*** Study on keratin. Jl. of Biol. Chem., **106**, 605 (1934), **112**, 361 (1935). S.A. — 271) ***P. Pulewka,*** Hornlös. Wirk. der Schwefelalkalien. Zs. phys. Chem., **146**, 130 (1925). — 272) ***I. B. Speakman,*** Micelle struct. of the wool fibre. Proc. Roy. Soc. **A 132**, 167 (1931). — 273) ***W. T. Astbury, S. Dickinson, K. Bailey,*** The X-ray interpret. of denat. and the struct. of the seed globulins. Biochem. Jl., **29**, 2351 (1935). S.A.; ***W. T. Astbury, W. A. Sisson,*** The config. of the keratin mol. and its orientation in the biol. cell. Proc. Roy. Soc. London, **A 150**, 533 (1935). S.A.; ***W. T. Astbury,*** Röntgenoskopie von Proteinfasern. Kolloid-Zs., **69**, 340 (1934); ***Ders.,*** Fundamentals of Fibre Structure, London 1933.

222), (274) auch amorphes Protein; s.a. 275); zur Lage der Seitenketten vgl. a. WRINCH 275a).

Ganz ähnlich wie Keratin verhält sich auch **Myosin** trotz seines geringen Schwefelgehaltes; es soll dem Keratin im Bau sehr nahestehen, Keratin also „vulkanisirtes Muskeleiweiß" sein (ASTBURY 276), 276a)). Seidenfibroin, β-Keratin und Fibrin sind als glattgestreckte Ketten röntgenographisch identisch. Dagegen sind Keratine aus Federn und von Reptilien viel komplicirter gebaut, wahrscheinlich enthalten sie verzweigte Ketten (ASTBURY 277)). Das gestreckte „β-Myosin" mit der gleichen Struktur wie β-Keratin usw. konnte von ASTBURY 278) neuerdings auch im gestreckten Muskel selbst nachgewiesen werden *). Nach WOODS 279) enthalten die Zellwände orientirtes α-Keratin, während das Keratin des Zellinnern desorientirt ist. Überhaupt sind die rückwärtigen Abstände nach ASTBURY und LOMAX 280) wohl von der Struktur der Mittelkette weitgehend unabhängig und betragen auch bei den meisten untersuchten Proteinen (Pflanzenglobuline, Edestin, Eier- und Serumalbumin, Casein etc.) etwa 4½ Å ($4{,}4_3$ bis $4{,}7_5$ Å), während die Seitenabstände je nach den in der Hauptkette enthaltenen Aminosäuren recht verschieden sein können; sie werden z.B. durch Eintritt von Lysin anstelle von Arginin erheblich (um etwa 1,5 Å) vergrößert (SPEAKMAN 269), ASTBURY, l. c. 222), 274)).

Kollagen-Gelatine. Hier handelt es sich immer wieder um die ja auch praktisch wichtige Frage, ob die technisch hergestellte Gelatine, chemisch Glutin, bereits ein hydrolytisches Abbauprodukt des genuinen Kollagens ist, oder ob die chemische und enzymtypische Resistenz des Kollagens nur auf seiner Unlöslichkeit, resp. besonderen Oberflächenbildungen beruht, nicht aber auf chemischen Structuren, wie wir sie ja nunmehr beim Keratin kennen gelernt haben. Man kann heute mit Sicherheit sagen, daß Kollagen und Glutin nicht chemisch verschiedene Körper sind, daß vielmehr ihr Unterschied nur auf der physikalischen Struktur beruht. Das haben sowohl enzymtypische wie röntgenographische Untersuchungen gezeigt.

Kollagen ist nicht absolut resistent gegen Trypsin, es wird aber auch nach Weichung (282) sehr viel langsamer angegriffen als Glutin. Und zwar liegt das daran, daß die völlig intakte Oberfläche der Faser überhaupt nicht angegriffen wird (281), sondern nur freie äußere Oberflächen nach der Zerschneidung von der Schnittfläche her (BERGMANN 282), 283), 284)).

Die einzelnen Fasern sind an ihren Seitenflächen also resistent. Dasselbe gilt für die Proteolyse durch Bakterien (LLOYD 285)). Auch KÜNTZEL 287) findet nach Zerschneidung stärkeren Abbau. Nach NAUEN 286) bewirkt Quellung durch Anionen der lyotropen Reihe oder

*) Der ruhende, gewaschene und getrocknete Muskel von *Mytilus edulis* enthält die gefalteten Ketten der α-Konfiguration (287a))

274) ***W. T. Astbury,*** The X-ray interpret. of fibre struct. Jl. Soc. Dyers Coll. **1933,** 169. S.A. — 275) Vgl. a. ***K. Linderstrøm-Lang, F. Duspiva,*** Die Verdauung von Keratin etc. Zs. phys. Chem., **237,** 131 (136) (1935). S.A. — 275a) ***D. M. Wrinch,*** The pattern of prot. Nature **137,** 411 (1936). — 276) ***W. T. Astbury, S. Dickinson,*** α, β-Intramol. transform. of myosin. Nature, **135,** 95 (1935). S.A. — 277) ***W. T. Astbury, T. C. Marwick,*** X-ray interpret. of the mol. struct. of feather keratin. Nature **130,** 309 (1932). — 278) ***W. T. Astbury, S. Dickinson,*** α-, β-Transform. of muscle prot. in situ. Nature, **135,** 765 (1935). S.A. — 279) ***H. J. Woods,*** The electr. orient. of wool cells. Proc. Leeds phil. Soc., **3,** III, 132 (1935). S.A. — 280) ***W. T. Astbury, R. Lomax,*** An X-ray study of the hydrat. and denat. of prot. Jl. of Chem. Soc. London **1935,** 846. S.A. — 281) ***R. H. Marriott,*** The action of trypsin on collagen. Jl. internat. Soc. Leather Trade Chem., **16,** 6 (1932). — 282) ***M. Bergmann, G. Pojarlieff,*** Verh. der nativen Lederhaut geg. Pankr. Bioch. Zs., **249,** 1 (1932). — 283) ***M. Bergmann, G. Pojarlieff,*** Trypt. Auflös. von Kollagen. Bioch. Zs., **269,** 77 (1934). S.A. — 284) ***M. Bergmann, G. Pojarlieff, H. Thiele,*** Einw. von Pankr. auf Gelatine u. Kollagen. Collegium, **10,** 581 (1933). S.A. — 285) ***D. J. Lloyd, M. E. Robertson,*** Struct. of collagen fibres. Nature, **133,** 102 (1934). S.A. — 286) ***F. Nauen,*** Bez. zw. Quellung und Proteol. des Kollagens. Bioch. Zs., **231,** 441 (1931). — 287) ***A. Küntzel, O. Dietsche,*** Einwirk. von Pankr. auf Kollagen. Bioch. Zs., **231,** 423, 435 (1931). — 287a) ***W. T. Astbury,*** X-ray stud. of prot. struct. Nature **137,** 803 (1936). S.A.

Benzoesäure u. dgl. ein Auseinanderdrängen der Fasern, so daß dann das Enzym neue Angriffspunkte findet. Isolirte Kollagenfasern (Sehnen) werden nach Quellung gelöst, im ursprünglichen Faserverband (Haut) auch dann nicht (281), ebenso nicht isolirte Fasern unter Spannung (288).

Es ist also jedenfalls die völlig intakte Kollagenfaser etwas gänzlich anderes in Bezug auf ihre Resistenz als ihre freigelegte äußere Oberfläche, und die Frage ist, ob hier nur Differenzen im räumlichen Bau obwalten, oder auch chemische Unterschiede vorliegen. Da uns hier nur die chemische Struktur des Kollagens, als reines Protein gedacht, interessirt, nicht aber der Bau der natürlichen Faser, so können wir auf dieses Problem nur hinweisen, so z.B. auf die zusammenfassenden kritischen Betrachtungen von HERINGA und KRUYT 289). Sie kommen zu dem Schluß, daß die Faser auch chemisch von der Gelatine schon deswegen verschieden ist, weil sie auch Mucin enthält, das mit der Muttersubstanz der Gelatine ein Komplex-coacervat bildet. Ferner auf die ausgedehnten Untersuchungen von KÜNTZEL 290) über die Fasern von Sehnen und Haut, ihre Quellung und Schrumpfung.

Auf Grund neuer Abbaustudien kommt SSADIKOW 291) zu der Überzeugung, daß bei der Pepsinwirkung auf Kollagen bis zum Glutinstadium keine Peptidbindungen gelöst werden.

Gegen eine Hydrolyse bei der Umwandlung von Kollagen in Gelatine spricht auch die Tatsache (WÖHLISCH 292)), daß es sich um eine stark endotherme Reaktion ($\Delta H = + 16{,}8$ cal je g) handelt, die bei ca. 60° einen scharf definirten Umwandlungspunkt hat. Dieser ist abhängig von der Zugspannung oder einem Seitendruck. WÖHLISCH sieht die Umwandlung des Kollagens in Gelatine demnach als einen Schmelzvorgang an, was in anderer Ausdrucksform der Auffassung von GERNGROSS 293) entspricht, der den Übergang von Kollagen in Gelatine als eine Aufhebung der räumlichen Anordnung an den Ketten-enden betrachtet (s. u.). Die Dehnung von Gelatine, die in gewissem Sinne eine Rückverwandlung in Kollagen bedeutet (s. u.), ist dementsprechend exotherm (GERNGROSS 293)).

Röntgenographische Untersuchung. Die Untersuchung des Aufbaus der Micelle im Röntgendiagramm hat vor Allem nach den Untersuchungen von GERNGROSS und HERMANN c.s. 294) ergeben, daß kein chemischer Unterschied zwischen Kollagen und Gelatine besteht. Im Groben betrachtet ist Glutin nichts anderes als ein ungeordneter Zustand der Hauptvalenzketten, im Gegensatz zum straff geordneten Bau des Kollagens, bei dem die Ketten „ausgerichtet" sind. Diese Ordnung wird beim Kochen zerstört, die Röntgendiagramme verschwinden, treten aber beim Dehnen wieder auf (GERNGROSS 296), KATZ 297), s.a. SHEPPARD 295)).

GERNGROSS und KATZ 299) hatten zunächst bei ihren Röntgenuntersuchungen zwei verschiedene Strukturbestandteile der Gelatine festgestellt, von denen der eine kristallinisch, der andere amorph sein sollte. Später (s. besonders GERNGROSS 293)) kamen sie zu folgender Auffassung: Das Gelatinemicell besteht aus langen Polypeptidketten, die in der Mitte des Micells gittermäßig miteinander gebunden sind, während sie am Rande „fransenartig" auseinanderstreben. Diese Fransen bilden die Verknüpfung von Micell zu Micell, sodaß sich im Ganzen ein dem räumlichen Fachwerk ähnliches Gebilde ergibt, in welchem *„die kristallinen Kerne die*

---

288) ***B. Pototschnig,*** Ferm.-Einw. auf Hautsubstanz etc. Diss. Darmstadt 1932; BPh **76,** 213. — 289) ***G. C. Heringa, H. R. Kruyt,*** Kollagen u. Gelatine. Chem. Weekblad, **28,** 142 (1931). S.A. — 290) ***A. Küntzel, F. Prakke,*** Morphol. und Feinbau der kollag. Faser. Bioch. Zs., **267,** 243 (1933). — 291) ***W. S. Ssadikow,*** Einige Bindungsarten im Eiweißmol. Bioch. Zs., **179,** 326 (1926). — 292) ***E. Wöhlisch,*** Thermodyn. der Wärmeumwandl. des Kollagens. Bioch. Zs., **247,** 329 (1932). S.A. — 293) ***O. Gerngross, K. Hermann, R. Lindemann,*** Revers. Sol-Gel Umw., Krystallis. der Gelatine etc. Kolloid-Zs., **60,** 276 (1932). S.A. — 294) ***K. Hermann, O. Gerngross, W. Abitz,*** Röntg. Strukturforsch. des Gelatinemicells. Naturw., **18,** 754 (1930); Zs. physikal. Chem., B **10,** 371 (1930). — 295) ***S. E. Sheppard, R. C. Houck,*** Struct. of gelatin etc. Jl. of physic. Chem., **36,** 2885 (1932). — 296) ***O. Gerngross,*** Feinbau der Gelatinemicellen. Zs. Angew. Chem., **43,** 910 (1930). — 297) ***I. R. Katz,*** Röntgenspektograph. Unters. v. Leimen u. Gelatine. Zs. Angew. Chem., **40,** 1443 (1927). — 298) ***D. J. Lloyd, R. H. Marriott, W. B. Pleass,*** The swelling of protein fibres. I. Collagen. Trans. Faraday Soc., **29,** 554 (1933). — 299) ***O. Gerngross, I. R. Katz,*** Herst. sehr stark gedehnter Gelatinepräp. u. deren Röntgendiagramm. Kolloid-Zs., **39,** 181 (1926).

Rolle der festen Punkte, die Fransen dagegen die Rolle der Bänder und Streben übernehmen und damit die Festigkeit, Elastizität und Biegsamkeit der Gallerten gewährleisten" (GERNGROSS c.s. **293**)).
Im Kollagen sind die Micelle durch das natürliche Wachstum ausgerichtet; durch das Kochen wird diese Ausrichtung gelöst; die verschiedenen Micelle liegen dann in der erkalteten Gelatine wirr durcheinander, wodurch das Vorliegen eines amorphen Strukturbestandteiles neben dem kristallinen in den Röntgendiagrammen vorgetäuscht wurde (**294**). Bei der Dehnung werden die Micelle wieder ausgerichtet, sodaß das Röntgendiagramm der Gelatine dem des Kollagens immer ähnlicher wird, je stärker man die Gelatine dehnt (**299**).

Über die Struktur nun des kristallinen Bestandteiles selbst gehen die Ergebnisse der verschiedenen Röntgenuntersuchungen und damit die Auffassungen von der Art der Bindungen noch etwas auseinander, wohl je nach dem Zustand, in dem sich das Material bei der Untersuchung befand. Im Durchschnitt ergibt sich für den Identitätsabstand längs der Faserachse in den Peptidketten ein Wert von 9,5 Å (**294**), für den Abstand zwischen den Ketten ein solcher von etwa 5 Å.

Dieser letztere wird von LLOYD **298**) in Anlehnung an ASTBURY's Auffassung von der Keratinstruktur (s. weiter oben) als *back bone linkage*, also Nebenvalenzbindung zwischen den einander gegenüberstehenden, in der Kette peptidisch gebundenen Gruppen — CO und NH — gedeutet. Senkrecht auf dieser Ebene stehen die Seitenketten-brücken zwischen den Peptidketten, die hier erheblich länger als beim Keratin, nämlich etwa 11,3 Å (**296**) bezw. 13 Å (**298**) sind. Für diese Seitenketten-brücken nimmt SHEPPARD **295**) echte Salzbindung an, ebenso wie ASTBURY (l. c. 274) für das Keratin. Diese Auffassung wird durch die Quellungsversuche von LLOYD c.s. **298**) bestätigt. GERNGROSS **296**) erwähnt daneben noch einen „*Kristallabstand von* 2,8 Å (KATZ und GERNGROSS **300**) 3,9 Å), *der von der Quellung unberührt bleibt und von Gitterebenen herrühren muß, die durch die periodisch sich wiederholenden hauptvalenzchemischen Peptidbindungen entstanden sind.*" Dieser spaltet bei starker Dehnung auf, ist also quer zur Dehnungsrichtung. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um den halben Identitätsabstand der *back bone linkages*.

Die Umwandlung von Kollagen in Glutin scheint, wenn man also Kollagen als reines Protein betrachtet und von anderen chemischen Beimengungen in der nativen Faser absieht, nichts anderes zu sein, als eine beginnende Zerstörung der micellaren Ordnung.

Das wird außerdem dadurch gestützt, daß weiteres langdauerndes Erhitzen alle physikochemischen Eigenheiten der „Gelatine" vernichtet (GERNGROSS **301**)). Das charakteristische Gelatinirungsvermögen verschwindet gänzlich, die Viskosität geht auf unter 20 % zurück. Dabei tritt aber immer noch keine Hydrolyse ein: die NH_2- und COOH-Werte bleiben unverändert. Auch in der noch typischen „Gelatine"-form des Glutins sind immer noch lange Faden-Gebilde vorhanden. Dies sind Aggregate mit einem Molatgewicht von 50—90.000, die dann zerfallen, bis zu einem Molgewicht von ca 4500, ohne daß wesentliche Hydrolyse erfolgt. Danach wäre der scheinbar so markante Übergang von Kollagen in Gelatine nur der Anfang einer kontinuirlichen chemischen Auflösung einer besonders geordneten Micellstruktur.

Nach SHEPPARD **295**) scheint dieser Process in gewissem Sinne umkehrbar zu sein, indem bei der Trocknung gedehnter Gelatine wieder teilweise Rückbildung von Kollagen erfolgt. Gedehnte Gelatine zeigt ja auch nach KATZ und GERNGROSS **300**) wieder Faserdiagramm. HERINGA (l. c. 289) hat jedoch Bedenken gegen die Beweiskraft derartiger Röntgenuntersuchungen.

Aus allen diesen chemischen wie röntgenographischen Untersuchungen muß man also den Schluß ziehen, daß die Faserstruktur des genuinen Kollagens es bedingt, daß die Peptidketten in straffer Anordnung „ausgerichtet" sind, d. h. der freien Beweglichkeit entbehren. Gerade darin sieht aber BERGMANN (l. c. 307) den allgemeinen physiko-chemischen Grund für die tryptische Resistenz, denn nach seiner Theorie des „ersten Angriffs" (§ 480) kann eine Anlagerung des Enzyms an die drei dazu nötigen Gruppen nur unter einer Verschiebung der räumlichen Anord-

---

300) ***I. R. Katz, O. Gerngross,*** Gelatine u. Kollagen. Naturw., **13,** 900 (1925). — 301) ***O. Gerngross c.s.,*** Therm. Desaggr. von Gelatine. Ber. Chem. Ges., **63,** 1603 (1930). Lit.

nung erfolgen, die bei normalen Proteinen möglich, bei faserförmig ausgerichteten, festgelegten Ketten aber unmöglich ist, vgl. Näheres § 478.

Chemische Einzelangaben. Über die Struktur des Glutins liegen einige Angaben vor, die bescheidene Rückschlüsse gestatten.

Im Kollagen fand GRASSMANN **302)** ein zum Protein selbst — nicht zum Mucoid — gehörendes **Kohlenhydrat**, und zwar je 1 Mol Galactose und Glucose in bisher unbekannter Bindung. Diese „Lactose" betrug 0,99 %. Unter der Annahme, daß wirklich diese beiden Gruppen nur einmal vorhanden sind, berechnet GRASSMANN ein Molgewicht von 34.500 (Kolorimetrische Methode mit Orcin).

Ein angebliches Dioxy-pyrryl-alanin, das ein specifischer Baustein des Glutins sein sollte, ist von EMERSON **303)** nicht gefunden worden. Es handelt sich wohl um Prolyl-glycin (s. u.). — Oxyprolin ist besonders leicht abspaltbar (MORSE **304)**, ZIMMERMANN, l. c. 134a), könnte danach an einem Kettenende stehen. Mit seiner Betainreaktion konnte ZIMMERMANN (l. c. 134a) im Glutin selbst kein endständiges Glycin nachweisen, wohl aber in den daraus erhaltenen Abbauprodukten (§ 475).

Erwähnenswert ist noch, daß von ABDERHALDEN (l. c. 65) **Fumarsäure** in den Hydrolysaten aufgefunden wurde, ohne daß jedoch Näheres über die Art ihrer Verknüpfung oder Bildung festgestellt werden konnte außer der Tatsache, daß die Fumarsäure nicht secundär aus Asparaginsäure entstanden ist.

Am wichtigsten sind Angaben von BERGMANN **305), 307)** und GRASSMANN über die Bindungsformen des **Prolins** im Glutin, das über 20 % Prolin + Oxyprolin enthält, weil sie tatsächlich einen gewissen Schluß auf den Bau der Kette zulassen. Nach den letzten Analysenzahlen von BERGMANN **306)** macht von sämtlichen Aminosäuren Glycin $^1/_3$ aus, Prolin (mit neuer Methode bestimmt) $^1/_6$, Oxyprolin $^1/_9$. (In Prozenten in g: Glycin 25,5, Prolin 19,7, Oxyprolin 14,4, in Gramm-molen %: 36, 18, 12).

Aus der Kongruenz von COOH und NH_2 (§ 478a) beim Abbau mit „Trypsin", d. h. Tryptase + Carboxy-polypeptidase, schließt BERGMANN **305)**, daß nur normale Peptidbindungen gelöst werden. Bei der nachfolgenden ereptischen Verdauung wird aber regelmäßig mehr COOH als NH_2 gelöst, sodaß BERGMANN die Lösung von Prolin-peptiden vom Typus des Glycyl-prolins annimmt. Dasselbe ist nach GRASSMANN (l. c. 184, **308)** bei dem Kyrin aus Glutin der Fall.

Es kommen also jedenfalls Bindungen des Prolins und nach BERGMANN wohl auch des Oxyprolins im Glutin vor, bei denen das Kern-N des Prolins peptidisch gebunden ist. Daraus und unter Berücksichtigung aller bisher über Glutin bekannten Daten hatte BERGMANN **306)** ein provisorisches Schema der Glutin-Kette aufgestellt, in dem × eine bisher nicht zu specialisirende andere Aminosäure ist (L = Lysin, P = Prolin (resp. Oxyprolin), G = Glycin):

I. —GP × G ×× GP × G ×× ... oder II. —G × PG × × G × PG × × ...

Nun hat aber GRASSMANN **308)** das Tripeptid Lysyl-prolyl-glycin isolirt; es kommt also auch die umgekehrte Prolin-bindung vor; d. h. Prolin ist sowohl mit dem Imid-N wie mit seinem Carboxyl gebunden. Das Tripeptid ist durch Nierenenzym spaltbar in Lysin und

---

302) ***W. Graßmann, H. Schleich,*** Kohlehydr.-Geh. des Kollagens. Bioch. Zs., **277,** 320 (1935). S.A. — 303) ***O. H. Emerson, C. L. A. Schmidt,*** Dihydroxy-pyrrol-alanin from gelatin hydrol. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, **32,** 291 (1934); BPh **87,** 23. — 304) ***W. Morse,*** Labil. of hydroxyproline in ... proteins. Jl. of Biol. Chem., **100,** LXXIII (1933). — 305) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich,*** Bindungsart des Prolins in der Gelat. Ber. Chem. Ges., **65,** 1747 (1933). S.A. — 306) ***M. Bergmann,*** Determ. of l-proline etc. Structure of gelatin. Jl. of Biol. Chem., **110,** 470 (1935). — 307) ***M. Bergmann,*** Rec. res. in the field of proteins and prot. enz. Jl. Am. Leather Chem. Ass., **29,** 353 (1934). S.A. — 308) ***W. Graßmann,*** Konst. des Glutokyrins. Bioch. Zs., **284,** 177 (1936).

Prolyl-glycin. Danach wäre 1 „×" = Lysin zu setzen, und dann kann man das Tripeptid in BERGMANN's Schema II (nicht in I)einsetzen wie folgt:

. . . GLPG × × G × PG × × . . .

4) Proteide.

Diese künstlich vereinigte Gruppe von Gebilden aus einem Protein und einer „prosthetischen Gruppe" ist im Begriff sich aufzulösen. Ganz für sich steht zweifellos die Untergruppe der Phosphoproteide, denn hier ist von einer prosthetischen selbstständigen Gruppe gar keine Rede: ihr P-Gehalt beruht auf einer einfachen Esterbindung der Phosphorsäure an die OH-Gruppe des Serins.

Die Nucleoproteide sind nichts anderes als salzartige, d. h. polar gebundene Symplexe von Nucleinsäuren mit Histonen oder sonstigen bisher unbekannten Proteinen. Die Chromoproteide sind entweder auch Symplexe des ganzen Porphin-gerüstes mit Globinen, oder es sind wahre Komplexsalze um das Eisen als Centralatom (CONANT **309)**). Dafür spricht, daß nach HAUROWITZ **310)** die Spaltung mit Trypsin-kinase weitgehend das Globin abbaut, ohne daß die Hämingruppe abgelöst wird. Ältere Vorstellungen über direkte Strukturbindungen zwischen Hämin und Globin (Ester oder Peptide) (KÜSTER **311)**) sind nach HAUROWITZ **310)** widerlegt. Als Vermittler des Schwermetallkomplexes könnten Schwefelgruppen dienen, oder Sterine (KÜSTER **311)**) oder Prolin (KÜSTER **312)**, WAELSCH **313)**). Alle diese Stoffgruppen bieten für den Aufbau der Proteine an sich keine neuen Gesichtspunkte und sind somit hier nicht zu behandeln.

Nur bei den Glykoproteiden steht noch das principielle Problem offen, ob auch sie nichts anderes sind, als polare Symplexe der komplexen N-haltigen Kohlenhydrate, sei es von einfachen Polysacchariden aus Glucosamin + Mannose oder auch Galactose, sei es von noch verwickelter gebauten Schwefelsäure-estern dieser Polysaccharide (§ 295). Erstere finden sich an den gelösten Mucoiden des Serums und Eiklars (z. B. LEVENE **314)**) und im „Eiweißzucker" des Blutes **(315)**, **(316)**; auch aus Tussahseide hat ABDERHALDEN (l. c. 78) Chitosamin isolirt. Die komplexen Säuren finden sich in den echten Mucinen und den Mucoiden des Knorpels, der Sehnen etc.

Man hat eigentlich stets angenommen, daß diese Stoffe eben aus zwei ganz getrennten Teilen bestehen, die irgendwie symplexmäßig miteinander verbunden sind; neuerdings z. B. MEYER **317)** (Glaskörper, Nabelschnur). Indessen hat schon ihr Auftreten in gelöster Form, besonders im „Eiweißzucker" Bedenken gegen solche rein äußerliche Bindung wachgerufen; und dann hat besonders die Feststellung von RIMINGTON **317a)** diese Annahme ins Wanken gebracht, daß nämlich auch die als einheitlich anzusehenden Serumproteine selbst den gleichen Polysaccharidkomplex aus Glucosamin + 2 Mannose enthalten, wie eben diese gelösten Mucoide; wenn man sie durch Spaltung des Proteins (auch durch Trypsin) isolirt, ist die Aminogruppe frei. Es ist also durchaus möglich, daß diese N-haltigen Polyosen nicht bloß äußerliche Anhängsel sind, sondern in die Peptidketten eingebaut, also als Glucosaminpeptide, wie dies

---

309) ***J. B. Conant, L. F. Fieser,*** Methemoglobin. Jl. of Biol. Chem., **62**, 595 (1924/5) — 310) ***F. Haurowitz, H. Waelsch,*** Bind. zw. Eiw. und prosth. Gr. im Blutfarbst. Zs. phys. Chem., **182**, 82 (1929); ***F. Haurowitz,*** Chromoproteide. Hb. der Bioch. Erg. Werk, Bd. I, 370. Jena 1933. — 311) ***W. Küster c.s.,*** Über den Blutfarbst. Zs. phys. Chem., **172**, 199 (1927). — 312) ***W. Küster c.s.,*** Über den Blutfarbst. Zs. phys. Chem., **170**, 106 (1927). — 313) ***H. Waelsch,*** Hydrol. von Blutfarbstoff etc. Zs. phys. Chem., **168**, 188 (1927). — 314) ***P. A. Levene c.s.,*** The carbohydrate group of ovomucoid. Jl. of Biol. Chem., **84**, 49, 63 (1929). — 315) ***Z. Dische,*** Natur des eiweißgebundenen Blutplasmazuckers. Bioch. Zs., **201**, 74 (1928). — 316) ***H. Bierry,*** Sucre protéidique etc. C. R., **191**, 1381, **192**, 240 (1930/1). — 317) ***K. Meyer, I. W. Palmer,*** Sugar radicals of some mucoids. Jl. of Biol. Chem., **109**, LXV (1935). — 317a) ***Cl. Rimington,*** Carbohydr. complex of the serum proteins. Biochem. Jl., **23**, 430 (1929), **25**, 1062 (1931).

besonders BERTHO 318) diskutirt. Dann wären es also überhaupt keine Proteide, sondern Proteine mit abweichendem Kettenbau, und würden auch mehr enzymologisches Interesse gewinnen. Einige „Gluco-peptide" synthetischer Herstellung fand BERGMANN 319) nicht spaltbar. BERTHO hat die von ihm synthetisirten, z. B. Tetraacetyl (di-alanyl-N) glucosamin, enzymtypisch noch nicht untersucht.

Der sogenannte „Eiweißzucker" wird nach YAMADA 320) durch Proteinasen zwar leichter dialysabel, gibt aber keinen freien Zucker ab; wohl aber durch Erepsin unter weiterer Verkleinerung des Moleküls. Danach scheinen also erst noch zuckerhaltige Peptide zu entstehen, die schließlich total zerlegt werden. MEYER 317) fand beim chemischen Abbau von Mucin ein S-freies Kohlehydrat fest an ein Polypeptid gebunden, in Gegensatz zu den Mucoiden. Einen Abbau von Mucoiden unter Freisetzung von reducirendem Zucker soll ein Ferment Lysozym bewirken, das in tierischen Schleimen, Eierweiß, Samen etc. vorkommt (**320a**)).

Phosphoproteide. Am erfolgreichsten war die Erforschung der Struktur dieser Gruppe von Proteiden durch die volle Aufklärung der letzten Bindung der Phosphorsäure. Alle früheren Annahmen oder Vermutungen, daß die Phosphorsäure irgendwie an Aminogruppen in den Peptidbindungen substituirt ist, haben sich als irrig erwiesen, eine „Amino-phosphorsäure" (H.W. S. 835) existirt nicht. In allen bisher untersuchten Phosphoproteiden gibt es vielmehr nur eine einzige nachweisbare Bindung der Phosphorsäure, und das ist die als Ester des Serins. Dies gilt ebensowohl für die Gruppe der Caseinogene, wie die der Vitelline und Ichthuline.

Diese Serin-Phosphorsäure als Objekt der Phosphatasen haben wir § 284 besprochen und dort auch die Literatur angegeben, die sich mit Serin-Phosphorsäure als einzigem phosphorsäurehaltigen letzten Spaltprodukt befaßt. Weiter haben wir § 469 die von LEVENE sowie G. SCHMIDT isolirte Glutaminyl-serin-phosphorsäure erwähnt (l. c. 138, 139), sowie § 475 die höheren, als *noyau phosphoré* bezeichneten Gebilde POSTERNAK's (l. c. 187/8) und das „Pepton" RIMINGTON's (s. u.). Das Dipeptid von SCHMIDT scheint noch ein Tripeptid mit Leucin zu enthalten (l. c. 138). Die Serin-phosphorsäure des Vitellins scheint nicht an eine Dicarbonsäure gebunden zu sein (LEVENE 321)); sie ist hier überhaupt anders verteilt (WISHART, l. c. 329).

Es kann also keinem Zweifel unterliegen, daß im Caseinogen selbst die Phosphorsäure an die Serinkomponente einer längeren Polypeptidkette gebunden ist und bei tiefer gehender Spaltung als Serin-phosphorsäure an sich oder in einfacherer peptidischer Bindung frei wird, und schließlich auch selbst durch irgend eine Phosphatase zerlegt wird.

Dagegen ist es noch gar nicht klar, wie die Phosphorsäure in den größeren Molekülen resp. im Caseinogen selbst weiter gebunden ist (Vitelline s. l. c. 329; Ichthuline sind darauf noch nicht untersucht). An sich ist es ja nicht verwunderlich, wenn man bei enzymatischer oder sonstiger Spaltung noch „Phosphopeptone" erhält, d. h. Gemische der verschiedenen Polypeptidketten, von denen eine irgendwo eine Serin-phosphorsäure endständig trägt. Diese Annahme tritt an die Stelle der von REH (*l. c. 187*), der schon das „Paranuclein" der älteren Autoren, also das erste Spaltprodukt, nur als ein einheitliches oder aus wenigen ähnlichen „Polypeptid-phosphorsäuren" bestehendes System betrachtet hat.

Die Dinge liegen aber sehr viel verwickelter; vor Allem verhält sich die Bindung der Phosphorsäure ganz verschieden bei peptischem und tryptischem Abbau. Nur bei letzterem entsteht ein Serin-phosphorsäure-komplex in einer solchen Form, daß er der Phosphatase zugänglich ist.

---

318) ***A. Bertho, J. Maier,*** Synth. peptidähnl. Körper aus Aminozuckern und Aminosäuren III. Zs. phys. Chem., **222,** 139 (1933). — 319) ***M. Bergmann,*** Neue Synth. und Enzymvers. im Eiweißgebiet. Klin. Ws. **1932,** 1569. S.A. — 320) ***Y. Yamada,*** Wirk. der Proteasen auf den org. gebund. Blutzucker. Mitt. Med. Ak. Kyoto, **6,** 1385 (1932); BPh **70,** 113. — 320a) ***K. Meyer c.s.,*** The nature of lysocyme action. Science, **79,** 61 (1934). — 321) ***P. A. Levene, E. Schormüller,*** Serine-Phosph. acid obt. on hydrol. of vitell. acid. Jl. of Biol. Chem., **103,** 537 (1933).

Bei der peptischen Verdauung entsteht also zunächst das sogenannte **Paranuclein**; dies ist aber bisher nichts anderes als ein Sammelbegriff für absolut nicht einheitliche Abbaustufen mit angereichertem P, das von 0,8 % des Caseinogens selbst auf 1—7 % steigen kann. Die einzige gemeinsame Eigenschaft ist die Unlöslichkeit (s.a. l. c. 197, S. 462). Ein halbwegs einheitliches Paranuclein erhielten erst HOLTER c.s. **322)** in den Anfangsstadien der Wirkung mit sehr schwachem Pepsin, wenn erst 1,5 % P freigesetzt ist. Dieses Produkt zeigt ein ziemlich konstantes Verhältnis P : N (0,12 gegen 0,05 beim Caseinogen). Es enthält ca. 30 % des N und 70 % des P. Bei fortgesetzter Pepsinwirkung geht es langsam wieder in Lösung. Man könnte also vielleicht in noch früheren Stadien ein Produkt erhalten, das das gesamte P des Caseinogens noch in dieser proteinähnlichen Form enthielte. Alle Fraktionen des Caseinogens mit verschiedenem P-Gehalt (s. u.) geben etwa dasselbe Produkt. Auch JONES und GERSDORFF (l. c. 335), **(327)** erhielten nach kurzem peptischen Angriff drei Fraktionen, von denen die erste und zweite unlöslich waren und fast das gesamte P enthielten, während die dritte, P-arme lösliche Fraktion das gesamte Cystin, sowie den größten Teil des Tryptophan, Tyrosin, Lysin, Arginin und Histidin umfaßte. UTKIN **327a)** hat die löslichen Anteile durch Uranylacetat gefällt. Er fand 2 definirbare Phasen, zuerst entsteht eine P-ärmere, dann eine P-reichere. (P : N 0,145 bzw. 0,285).

Paranuclein ist also noch ein hochmolekulares Produkt, und es scheint auch nicht von großem Belang zu sein, ob es sich gerade um diese unlösliche oder eine lösliche Form handelt. Denn die sehr wichtige Feststellung RIMINGTON's **323)—326)**, daß Phosphatase auf alle durch Pepsinwirkung erhaltenen Produkte ebenso wie auf Caseinogen selbst ohne jeden Einfluß ist, daß also die Serin-Phosphorsäure noch irgendwie maskirt ist, gilt für das unlösliche Paranuclein jeglicher Zusammensetzung ebenso wie für lösliche Anteile. Dagegen wird die Phosphorsäure aus künstlich phosphorylirten Proteinen (Globulin) ohne weiteres durch Pepsin, auch HCl allein, wieder abgespalten; sie ist hier wahrscheinlich ganz anders gebunden, denn Phosphatase wirkt auch hier nicht **(324)**. Man kann sich vorstellen, daß durch diese primäre Wirkung des Pepsins das Molekül zunächst in einen P-freien und einen P-haltigen Anteil zerfällt, was mit den Vorstellungen übereinstimmt, daß die gesamte Serin-phosphorsäure beim Caseinogen zusammen an einem Komplex sitzt, eben dem „*noyau phosphoré*" POSTERNAK's.

Dieses Zusammenbleiben der gesamten Phosphorsäure läßt sich nämlich auch beim tryptischen Abbau noch konstatiren. Tryptase spaltet Caseinogen sehr schnell tief auf; dabei läßt sich feststellen, wie bereits BAYLISS und PLIMMER (*l. c. 188*) fanden, daß das gesamte P in eine organisch gebundene, nicht mehr durch Säure fällbare Form übergeht. Dabei sind etwa 13 % des Total-N freigesetzt. Freie Phosphorsäure tritt sehr langsam auf, wohl durch OH-Ionen. Aus diesem Gemisch haben nun RIMINGTON und KAY ein „**Phosphopepton**" isolirt, das 60 % des gesamten P des Caseinogens enthält; 4 % P und 10,5 % N. RIMINGTON **326)** hält es für einen einheitlichen Körper komplicirten Baus, ein Polypeptid mit 9 Gliedern und 3 Phosphorsäuren, was sicherlich nicht zutrifft (s. u.). Es ist vielmehr sicherlich ein Polypeptidgemisch weitgehenden Abbaus, denn LEVENE c.s. (l. c. 139) haben bereits nach kurzer Trypsinverdauung das Dipeptid Glutaminyl-serin-phosphorsäure isolirt. Allem Anschein nach besteht dieses „Pepton" durchgehend aus so weit aufgespaltenen Ketten, daß nunmehr eine kräftige Phosphatase (Niere) die gesamte Phosphorsäure freisetzt, während allerdings Knochenphosphatase nur $^2/_3$ der Phosphorsäure ablöst (s. u.). Andererseits kann man dem Caseinogen durch 0,25 m-NaOH die gesamte Phosphorsäure entziehen, dabei geht aber ein erheblicher

322) ***H. Holter***, Zur Konstitution des Pepsins. Zs. phys. Chem., **196**, 1 (1931); ***H. Holter***, ***K. Linderstrøm-Lang***, ***I. B. Funder***, Pept. Abbau des Caseins. Zs. phys. Chem., **206**, 85; C. R. Trav. Lab. Carlsb., **19**, Nr. 10 (1932). S.A. — 323) ***Cl. Rimington***, ***H. D. Kay***, Phosphor. from caseinogen etc. Biochem. Jl., **20**, 777 (1926). — 324) ***Cl. Rimington***, Phosphoryl. of proteins. Biochem. Jl., **21**, 272 (1927). — 325) ***Cl. Rimington***, Dephosph. caseinogen etc. Biochem. Jl., **21**, 204 (1927). — 326) ***Cl. Rimington***, Phosph. of caseinogen. Biochem. Jl., **21**, 1179, 1186 (1927). — 327) ***D. B. Jones***, ***C. E. F. Gersdorff***, Dig. stud. in vitro. Jl. Biol. Chem., **100**, LVIII (1933). — 327a) ***L. Utkin***, Peptische Caseinspaltung. Bioch. Zs. **288**, 233 (1936).

Teil Amid-N mit fort, es entweicht NH_3. Das Dephospho-caseinogen ist nicht mehr durch Lab coagulirbar (**325**). Auch STIRLING und WISHART **328**) schließen sich der Ansicht an, daß im Caseinogen die Seringruppen dicht beieinander sitzen. Bei Pepsinwirkung wird relativ wenig „säurelöslicher Phosphor" gegenüber „säurelöslichem N" freigesetzt, während es bei Trypsin umgekehrt liegt. Sie halten die beiden Abbaustufen Paranuclein und das RIMINGTON'sche Pepton für charakteristisch für die beiden Fermente (**328**); in jedem Fall aber entstehen typische P-reiche Abbauprodukte mit zusammengehaltenen Phosphorsäuregruppen. Schnelle Abspaltung des säurelöslichen P durch Trypsin auch JUKES **329a**).

Für Vitellin soll das nicht der Fall sein; hier liegen die Phosphorsäure-kerne weit auseinander oder sind ungleichartig, einer verhält sich wie beim Casein, der andere ist gegen Enzyme sehr resistent (**328**), (**329**). Die Pepsinwirkung liefert das alte **„Hämatogen"** von MIESCHER, mit einem Verhältnis N : P = 4,25.

Zusammenfassend ergibt sich: erstens, daß einfaches Einführen von Phosphorsäure in Proteine die Phosphorsäure gegen Pepsin resp. HCl nicht fest macht, während Pepsin aus Caseinogen selbst keine (oder sehr wenig) Phosphorsäure frei macht. Ferner, daß tryptische Verdauung tief abbaut, und dabei Polypeptide entstehen, die durch Phosphatase gespalten werden, während das genuine Protein und die peptischen Abbauprodukte die Phosphorsäure in gegen Phosphatase geschützter Form enthalten. Dies hat auch RIMINGTON selbst angenommen. Wenn man auf die allerdings etwas brutale Herausschlagung der Phosphorsäure durch NaOH zugleich mit Ammoniak Wert legen könnte, würde dies darauf deuten, daß die Phosphorsäure mit einem zweiten OH an Asparagin oder Glutamin gebunden sein könnte. Wahrscheinlicher aber ist, daß sie mit mehreren Oxygruppen verbunden ist, wie RIMINGTON annimmt, wenn auch weder seine Beweisführung (Knochenphosphatase nur $^2/_3$, Nierenphosphatase die gesamte Phosphorsäure) noch seine specielleren Vorstellungen begründet sind. Das „Pepton" soll 9 Oxyaminosäuren enthalten (Serin, Oxyglutaminsäure, Oxyaminobuttersäure), dazu 3 Phosphorsäuren. Zwei davon sind primär gebunden, eine secundär an zwei „benachbarte" Oxyaminosäuren. Wenn eine solche Bindung überhaupt existirt und nicht eine andere Maskirung der Phosphorsäure vorliegt, sollte man viel eher hier einmal an eine wirkliche hauptvalenzmäßige Querverbindung zwischen den Ketten (§ 477) denken. Indessen ist das alles noch unklar.

RIMINGTON's Einzelangaben sind sicher unrichtig. Wie LEVENE c.s. mit Sicherheit nachgewiesen haben, ist die gesamte Phosphorsäure an Serin gebunden, eine Bindung an Oxyglutaminsäure und Oxy-aminobuttersäure ist also ausgeschlossen, letztere wahrscheinlich garnicht vorhanden. Sie stimmen auch absolut nicht mit den Ergebnissen von POSTERNAK und von LEVENE überein. POSTERNAK (l. c. 187/188) fand in seinem Lactotyrin viel weniger P; an Aminosäuren: 4 Serin-phosphorsäuren zusammen, ferner 3 Glutaminsäure : 3 Isoleucin: 1 Asparaginsäure. (Weitere Kritik l. c. 197). Ein wieder von beiden verschiedenes Phosphopepton hat GRABAR **330**) mit Tryptase bekommen (P = 2,2 %; N : P = 13,2).

LINDERSTRØM-LANG (l. c. 197) schlägt vor, vorläufig den Phosphorkern des Caseinogens wie folgt zu formuliren (auf Grund der Angaben von POSTERNAK):

— Glut.-SerinPhS.-SerinPhS.-SerinPhS.-SerinPhS.-Asparagins. —

Will man dann mit RIMINGTON die Oxyglutaminsäure noch berücksichtigen, so kann dies durch Verlängerung der Kette geschehen oder man kann annehmen, daß eine Komponente des Caseinogens Oxyglutaminsäure anstatt Glutaminsäure enthält. Nimmt man aber mit SCHMIDT (l. c. 138) die Glutaminyl-Serin-phosphorsäure als Hauptkomponente, so käme durch Kombination mit POSTERNAK folgende Kette in Vorschlag:

— Glut. SerinPhS.-Glut. SerinPhS.-Glut. SerinPhS.-Asparaginsäure-Serin-Serin-Serin-Serin —

Sonst ist über die Struktur des Caseinogens ebensowenig Näheres bekannt, wie bei den übrigen Proteinen. Auch die exakten Untersuchungen LINDERSTRØM-LANG's **331**), daß mehrere

---

328) ***J. D. Stirling, G. M. Wishart,*** Hydrol. of caseinogen etc. Biochem. Jl., **26,** 1989 (1932). — 329) ***J. H. Blackwood, G. M. Wishart,*** Hydrol. of lecithovitellin etc. Biochem. Jl., **28,** 550 (1934). — 329a) ***T. H. Jukes,*** Meas. of trypt. dig. by direct titrat. Jl. of Biol. Chem., **109,** XLVII (1935). — 330) ***P. Grabar,*** Stad. init. de la dig. de la caseine etc. Soc. Biol., **112,** 1539, **114,** 13 (1933). — 331) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Einheitl. des Caseins. Zs. phys. Chem., **176,** 76 (1928).

Caseinogene existiren, die im üblichen Präparat vereinigt sind, und die mehrfach bestätigt und erweitert worden sind (**332—334**), haben für das engere Problem des Baues dieser Gruppe von Proteinen keine wesentlichen Gesichtspunkte ergeben. Wir wollen uns damit begnügen, auf diese Arbeiten hinzuweisen. JONES und GERSDORFF **335)** nehmen in Übereinstimmung mit LINDERSTRØM-LANG an, daß Casein kein einheitlicher Stoff, sondern ein reversibel dissoziables Komponentensystem im Sinne SØRENSEN's (vgl. a. S. 616) aus mehreren, durch Nebenvalenzen lose aneinander gebundenen Polypeptiden sei, das bei Einwirkung verschiedener Mittel zusammen als Gemisch ausfällt. — GIZA **334)** nimmt an, daß die verschiedenen Casein-Fraktionen verschiedene Phosphorylirungsstufen im biologischen Bildungsprozeß des Caseins in der Milchdrüse darstellen.

V. Die Fermentwirkungen im Abbau.

§ 478. Daß wir die Fermentwirkungen beim Abbau der genuinen Proteine noch nicht, und nicht einmal in den wesentlichen Einzelheiten klarlegen können, ergibt sich nach dem bisher Gesagten angesichts unserer noch überaus spärlichen Kenntnisse über den Bau der Proteine von selbst. Solange wir nicht wissen, in welcher Art eine der drei typischen Proteinasen ihr Werk beginnt und weiter führt, können wir keine Differenzirung dieser Gruppen nach ihrem Abbautypus vornehmen. Und solange wir über die Unterschiede im Bau zwischen den chemisch genau bekannten spaltbaren Polypeptiden und den genuinen Proteinen nichts wissen, kann man auch über die Wirkungsverschiebungen zwischen Peptidasen und Proteinasen nichts Sicheres aussagen.

Das Einzige, was man mit ziemlicher Resignation sagen muß, ist das, daß alles ältere Material, wie wir es im H.W. S. 836 gegeben haben, ziemlich wertlos geworden ist. Die ganzen Bemühungen um die „Antigruppe" und „Hemigruppe", um „trypsinresistente" Gruppirungen im Proteinmolekül, haben ins Leere gegriffen. Das Einzige, was davon übrig geblieben ist, ist eben die Tatsache, daß bei jedem Angriff durch eine der drei Proteinasen nicht nur, was ja heute selbstverständlich ist, gegen alle Proteinasen resistente Polypeptide zurückbleiben, sondern daß auch jede der drei Proteinasen noch Restgruppen zurückläßt, die den anderen Proteinasen Angriffspunkte bieten. (Eine Ausnahme soll das Ovalbumin sein, s. l. c. 366). Dagegen konnten wir schon im H.W. die Annahme ausschließen, daß voll aktivirtes „Trypsin", im älteren Sinne, d. h. eben ein Gemisch von Tryptase *) und Peptidasen, irgendwelche Gruppen (Antigruppen) intakt läßt. An dem Fundament der ganzen Betrachtung, daß nämlich durch geeignete Fermentsysteme das Protein schließlich restlos in freie Aminosäuren aufgespalten wird, ist nicht mehr zu zweifeln. Wo hier scheinbare Abweichungen auch heute noch beobachtet

---

*) Zur Benennungsfrage möchte ich hier kurz betonen: „Trypsin" ist kein Ferment, sondern ein Präparat aus Pankreas. Es enthält in den älteren Arbeiten noch alle Peptidasen des Pankreas. Später nach Abtrennung der Dipeptidase und Aminopolypeptidase immer noch die Carboxypolypeptidasen. Und nach deren Abtrennung erwies sich der Rest des „Trypsins" als überhaupt wirkungslos. Es enthält das Enzym Tryptase in inaktivem Zustand, das hier durch Enterokinase aktivirt werden kann. In anderen Fällen (Leukocyten) ist das Enzym Tryptase an sich aktiv. Ich nenne also Tryptase das aktive oder aktivirte Enzym bestimmter Wirkungsart irgendwelchen Vorkommens, frei von Carboxypolypeptidasen; es entspricht also dem Ausdruck: Trypsinkinase in den späteren Arbeiten von WALDSCHMIDT-LEITZ u.a.; ebenso auch dem „Trypsin-NORTHROP".

332) ***Br. Jirgensons***, Frakt. des Caseins. Bioch. Zs., **268**, 414 (1934). — 333) ***J. Gróh c.s.***, Fraktion. des Caseins. Zs. phys. Chem., **226**, 32 (1924). — 334) ***T. Giza***, Res. on casein. Bull. internat. Acad. Polon. Sci. A. **1934—35**, 421; BPh 88, 349. — 335) ***D. B. Jones, C. E. F. Gersdorff***, Stud. on. digest. of proteins in vitro. Jl. of Biol. Chem., **106**, 707 (715) (1934).

werden, da handelt es sich entweder nur um Unterschiede in der Geschwindigkeit des Abbaus; oder es fehlt eines der specifischen Fermente.

Um nur einen Fall anzudeuten: man hat das Glutin als Hauptvertreter der Antigruppe angesehen, das gegen Pankreasenzym relativ resistent ist insofern, als größere Komplexe übrig bleiben, während Pankreas + Darmerepsin es total aufspalten (COHNHEIM, *l. c. 204*). Dabei handelt es sich wohl sicher um Prolin-peptide, deren Spaltung durch Störung der Wirkung der speciellen Prolin-peptidase gehemmt war (BERGMANN l. c. 368); auch in anderen „Antipeptonen" aus Caseinogen, Edestin etc. ist der reiche Gehalt an Prolin und Glycin aufgefallen (*l. c. 196, 198*).

Wollen wir also die Lehre von den Fermenten im Abbau hier schildern, so müssen wir sozusagen neu anfangen und sehen, welche Mittel uns zur Prüfung dieser Frage zur Verfügung stehen und welche Ergebnisse sich etwa mit ihnen erzielen lassen. Diese Mittel kann man ganz im Groben danach einteilen, daß es sich um Untersuchungen an den Proteinen selbst handelt, oder daß definirte Polypeptide als Modelle dienen; an diesen kann man die Wirkungen der auf sie angepaßten Enzyme studiren und daraus mit mehr oder weniger Sicherheit Analogieschlüsse ziehen auf die Vorgänge an den Proteinen selbst. Mit der Wirkung der Peptidasen an sich werden wir uns hier nicht im Einzelnen befassen; soweit allgemeine Fragen des Angriffs und der Spaltung zu behandeln sind, sollen sie uns wie gesagt nur als Modelle dienen; und darüber hinaus fallen die Probleme mit denen der Specifität und Systematik der Peptidasen selbst zusammen, die uns §§ 497 ff. beschäftigen werden.

Wir kommen derart zu folgender Disposition des Materials:

I. Studien an den Proteinen selbst.

1) Absolute oder relative Fermentresistenz im Zusammenhang mit dem Aufbau.
2) Allgemeine Wirkung aller drei Proteinasen.
3) Stufenweise Wirkung der drei Proteinasen.

Anhang. Sonderwirkungen auf specielle Proteine und proteinähnliche Stoffe.

II. Polypeptide als Modelle.

1) Allgemeine und strukturelle Erwägungen über den Ansatzpunkt und die Wirkung der Proteinasen in Analogie oder im Gegensatz zu den Peptidasen.
2) Der „erste Angriff" der Proteasen nach Modellreaktionen an Polypeptiden.

Als Anhang sind dann in wenigen Worten die angeblichen Synthesen von Proteinen durch Enzyme zu behandeln.

I. Abbaustudien an den Proteinen selbst.

1) Enzymresistenz.

Eine absolute Resistenz genuiner Proteine gegen sämtliche Proteinasen ist sehr selten. Vielfach hat sich herausgestellt, daß eine absolute Resistenz nur eine relative ist, d. h. daß die betr. Substrate nur mehr oder minder verlangsamt angegriffen werden, wie dies z. T. schon im H.W., z. B. beim Elastin, angegeben worden ist (H.W. S. 900, 948). Auch die Resistenz des Seidenfibroins ist insofern nicht absolut, als zwar der eigtl. „Seidenkristall", d. h. die einfache Glycyl-alanin-kette nicht angegriffen wird, wohl aber die dem Mischmicell beigemengten anderen Ketten. Absolut resistent scheinen nur die Keratine und einige nahe verwandte, aber daraufhin mit modernen Mitteln

nicht untersuchte Skleroproteine zu sein. Hier kennen wir auch die ganz besondere Ursache dieser Resistenz in der festen Verknüpfung der Hauptvalenzketten einerseits durch polare Bindungen, andererseits durch —S—S-Gruppen (§ 477). Hebt man diese Bindungen durch alkalische Hydrirung auf, so verbleibt ein normales, durch Proteinasen spaltbares Protein. Dieser Fall könnte also sehr lehrreich sein, wenn er nicht eben isolirt dastünde.

Genuines Keratin ist wirklich absolut resistent. Das ist in neuerer Zeit mehrfach angezweifelt worden, um so mehr, als Kleidermotten und Pelzmotten (**336**), (**337**) tatsächlich Keratin als Hauptnahrungsmittel verdauen können, s. a. Krüger **338**). Andererseits glauben Stanković c.s. **339**) nicht nur eine Verdauung von Federn im Darm von Raubvögeln, sondern sogar die Sekretion einer Keratinase im Kropfsaft nachgewiesen zu haben. Mangold **340**) konnte hingegen einen chemischen Abbau von Federn im Darm bei keinem Wirbeltier auffinden, auch nicht bei dem Raubvogel *Syrnium aluco*, dem Waldkauz. Es blieb also nur die sichergestellte Verdauung bei haarfressenden Insekten, deren chemischer Weg nunmehr von Linderstrøm-Lang **341**) aufgeklärt worden ist. Der Darm der Larven der Kleidermotte *Tineola biselliella Humm.* enthält eine kräftig wirkende Proteinase mit einem relativ alkalischen ph-Opt. (ca. 9,5), wie bei anderen Insekten auch. Diese wirkt aber in vitro nicht auf Keratin, während im Darm selbst Abbau erfolgt. Die Wirkung tritt demnach nur dann ein, wenn eine starke Reduktionslage gegeben ist, wie sie im Darm (vielleicht durch Bakterien) physiologisch vorliegt; im Versuch konnte sie durch Zusatz von Thioglykolsäure geschaffen werden. Die Verdauung geht also denselben Weg der hydrirenden Zerlegung des genuinen Keratins wie ihn Goddard und Michaelis (l. c. 270) experimentell gegangen sind; es wird nicht das Keratin enzymatisch gespalten, sondern das hydrirte Keratein, das ein ganz normales enzymempfindliches Protein ist. Das Darmenzym ist keine Tryptase, da es durch Thiole nicht gehemmt wird, nähert sich also wie beinahe alle Proteinasen der Wirbellosen dem Kathepsin.

Immerhin bietet der Fall des Keratins doch einen Anknüpfungspunkt für eine allgemeinere Erwägung, wie sie Bergmann **342**) formulirt. Nach seiner Theorie des ersten Angriffs (§ 480) ist der erste Akt die Anlagerung des Enzyms an drei Gruppen: bei den am besten untersuchten Dipeptiden sind dies die Peptidbindung, das benachbarte Carboxyl und die benachbarte Aminogruppe. Dadurch wird das Substrat in eine bestimmt ausdrückbare räumliche Konfiguration hineingezwungen. Legt man diesen Modus allen Protease-wirkungen zu grunde, indem man für Carboxyl und Aminogruppe allgemeiner negative und positive polare Gruppen setzt, so bedeutet dies eine räumliche besondere Anordnung an den Angriffsstellen der Ketten. Diese ist aber eben vorher nicht dagewesen; ihre Ausbildung setzt also eine gewisse freie Beweglichkeit der Ketten voraus. Diese ist nun bei den löslichen Proteinen tatsächlich vorhanden; wo sie aber fehlt, kann zum mindesten Tryptase nicht wirken. (Bei Pepsin liegen wegen der hohen Acidität etwas andere Bedingungen vor, s. u.). Es ist nun im Princip gleichgültig, ob diese Versteifung der Ketten chemisch bedingt ist, wie wir es eben beim Keratin berichtet haben, oder ob sie durch die genuine Faserstruktur rein mechanisch-morphologisch hervorgerufen wird, wie beim Kollagen. Dies erklärt also, weshalb

---

336) ***E. Titschack,*** Beitr. zu einer Monographie der Kleidermotte. Zs. techn. Biol., **10,** 1 (1922). — 337) ***Fr. N. Schulz,*** Verdau. der Raupe der Kleidermotte. Bioch. Zs., **156,** 124 (1925). — 338) ***P. Krüger,*** Vergl. Enzymstoffw. der niederen Tiere. Erg. Phys., **35,** 538 (1933). S.A. — 339) ***R. Stanković c.s.,*** Enzym. Hydrol. des Keratins. Zs. phys. Chem., **181,** 291 (1929). — 340) ***E. Mangold,*** Verdaulichk. der Hornsubstanz etc. Sitzber. Ges. naturf. Freunde, Berlin **1930,** 286. S.A. — 341) ***K. Linderstrøm-Lang, F. Duspiva,*** Verdau. von Keratin etc. Zs. phys. Chem., **237,** 131 (1935). S.A. — 342) ***M. Bergmann,*** Rec. res. in the field of proteins and proteol. enz. Jl. Amer. Leather Chem. Ass., **29,** 353 (1934). S.A.

genuines Kollagen in der Faser selbst nicht angreifbar ist, sondern nur an den freien Enden (§ 477a), während das nicht mehr geordnete Glutin leicht angegriffen wird. Man wird dieses Argument überall mit zu Rate ziehen müssen, wenn es sich um die Resistenz genuiner Proteine handelt, vielleicht auch bei solchen, wo keine Unlöslichkeit und morphologische Struktur vorliegt, wie bei den genuinen Albuminen und ihrer sehr erheblichen Resistenz gegen Tryptase (s. u.). Zunächst käme diese Erwägung bei dem ebenfalls faserförmigen Seidenfibroin auch in Frage, da wir über die Ursachen seiner sogenannten Enzymresistenz, die allerdings nur beim eigentlichen „Seidenkristall" absolut ist, bisher nichts wissen.

Vielleicht ist sie rein chemisch bedingt durch den alleinigen Gehalt an bestimmten Monoaminosäuren (Glycin, Alanin), also eventuell ganz direkt durch eine fehlende Enzymaffinität, da für diese bei längeren Ketten gewisse Aminosäuren, wie z. B. Tyrosin, oder allgemeiner gesagt, polare Seitenketten überhaupt als Anheftungspunkte des Enzyms nötig zu sein scheinen. Auch die Annahme langgestreckter Ringe, also anhydrischer Kettenenden nach Waldschmidt-Leitz (l. c. 209) ist hier in Betracht zu ziehen. Vielleicht sind aber auch räumliche Lagerungen, Festlegung der Ketten, Abschirmung der bindenden Gruppen in irgend einer Form verantwortlich. Dagegen spricht freilich in gewissem Sinne, daß aus demselben Micell heraus die anderen Hauptvalenzketten, die u. a. Tyrosin und Prolin enthalten, langsam angegriffen werden, wenn man nur den festen Zustand aufhebt (§ 477a).

Wenn es also tatsächlich die reinen Glycyl-alaninketten sind, welche die Resistenz verursachen, dann könnte dieser Fall überaus wichtig sein für die Auffassung, daß die Proteinasen nur durch Ansatz an polaren hydrophilen Seitenketten (phenolisches OH, COOH oder NH_2) wirken können, aber nicht an einfachen, nur apolare Seitenketten enthaltenden Mono-aminosäuren (§ 479a). Leider ist auch dieser Fall des Seidenkristalls ganz vereinzelt, und bietet deshalb keine Gewähr. Jedenfalls erbringen die Probleme der absoluten Resistenz für die Frage der Fermente im Abbau keine wesentlichen Gesichtspunkte. Etwas mehr sagen schon die Beobachtungen über relative Resistenzen aus. Relativ, das will sagen, daß ein Protein gegen eine der beiden Hauptproteinasen ganz resistent ist oder sehr langsam angegriffen wird, von der anderen dagegen schnell gespalten wird. Wir sprechen hier in der Hauptsache nur von Pepsin und Tryptasen, die Papainasen wirken im Allgemeinen den letzteren ähnlich; wo wichtige Unterschiede vorliegen, werden wir sie erwähnen.

Auch hier müssen wir einen sehr markanten Fall als theoretisch ergebnislos bei Seite stellen. Warum die Protamine im Gegensatz zu den nur wenig komplicirter gebauten Histonen resistent gegen Pepsin sind (§ 477), wissen wir nicht. Diese Tatsache ist um so auffallender, als man annehmen sollte, daß gerade diese stark basischen Proteine eine starke Affinität zum Pepsin haben sollten (§ 479a). Aus diesem Grunde ist eine Annahme von Steudel 343), daß das Fehlen gerade saurer Gruppen (Glutaminsäure etc.) die Pepsinresistenz der Protamine erklären sollte, nicht wahrscheinlich. Eher ist anzunehmen, daß hier eben einfach die Kette zu kurz ist, und die Protamine sich in dieser Hinsicht wie Polypeptide mäßiger Kettenlänge verhalten, die ja wie alle Polypeptide vollkommen resistent gegen Pepsin sind. Pepsin ist eben von den Peptidasen ganz scharf getrennt, während zwischen Tryptase und tryptischer Carboxypolypeptidase keine so scharfe Grenze gezogen ist, wie die gelegentlichen Beobachtungen über Spaltung von höheren Polypeptiden durch Tryptase zu zeigen scheinen. Auch der Angriff der Protamine durch die Protaminase, die eine specielle Carboxy-polypeptidase ist (Waldschmidt-Leitz, l. c. 235) spricht für ihre Polypeptidnatur; gegen Amino-polypeptidasen sind sie freilich resistent, was rein strukturell durch die Endgruppe (Prolin?) bedingt zu sein

343) ***H. Steudel c.s.***, Charakt. der Pepsinwirk. Zs. phys. Chem., **154**, 21 (1926).

scheint, in Kombination mit der Kettenlänge (LINDERSTRØM-LANG, l. c. 197, S. 440). Die Resistenz der Mucine gegen Pepsin hat wohl ganz sekundäre Ursachen, nämlich die Besetzung der basischen Angriffsgruppen durch die Polyose-säuren (H.W. S. 839); durch Trypsin werden sie zerlegt, freilich auch sehr langsam (ANDERSON **344)**); Lysozym s. l. c. 320a.

Viel interessanter sind die umgekehrten Fälle, in denen Pepsin sehr schnell wirkt und zu noch hohen Abbauprodukten führt, die dann ohne weiteres von Tryptase gespalten werden, während diese primär auf das genuine Protein sehr langsam wirkt, so daß bisweilen, so beim genuinen Kollagen, eine beinah völlige Resistenz auftritt. Dasselbe Phänomen beobachtet man aber auch sehr weitgehend beim genuinen Serumalbumin, Serumglobulin und Ovalbumin, die von Pepsin spielend gespalten werden (OPPENHEIMER, *l. c. 209*) (s. a. H.W. S. 901).

Besonders charakteristisch ist dabei, daß bereits eine ganz kurze Vorbehandlung mit Pepsin-HCl genügt, um diese Resistenz aufzuheben, wie OPPENHEIMER bei Serumeiweiß fand und neuerdings z. B. ABDERHALDEN **345)** bei Serumglobulin und COHN **346)** bei Eiereiweiß bestätigt haben. Hierbei scheint die Säure ebenso wichtig zu sein wie das Pepsin; dazu sei an eine Beobachtung von THOMAS (H.W. S. 900, *l. c. 58*) erinnert, daß Kollagen bei ph = 5,9 von Tryptase gespalten wird. Analog wirkt aber auch die Koagulation, also die Denaturirung, wie OPPENHEIMER (*l. c. 209*) fand und vielfach bestätigt worden ist, z. B. bei Hämoglobin und Muskeleiweiß (RIGONI **346a)**), bei Ovalbumin von COHN **346)** und LIN (l. c. 409). Hier handelt es sich nur um eine starke Verlangsamung, denn nach CALVERY (l. c. 366) ist bei genuinem Ovalbumin + Trypsin nach längerer Zeit derselbe Endzustand wie beim Koaguliren erreicht. Dazu sei noch bemerkt, daß Ovalbumin gegen nicht aktivirtes Papain in genuinem Zustande resistent ist, aber nicht gegen aktivirtes Papain. Wenn man nun Ovalbumin koagulirt, so werden dabei SH-Gruppen frei, die als Aktivatoren des Papains wirken (GRASSMANN **347)**). Auch Pflanzen-proteine werden nach RONCATO **347a)** durch Pepsin wie Hitzedenaturirung der Tryptase leichter zugänglich.

Hier liegen nun aber zweifellos sehr verwickelte Verhältnisse vor. Einen Teil der Resistenz der genuinen Substrate wird man jedenfalls auf Hemmungskörper zurückführen, worauf wir im speciellen Teil bei Tryptasen und Kathepsin zurückkommen werden; diese werden durch stärkere Acidität oder Kochen zerstört oder durch Aktivatoren überwunden, wie dies beim Ovalbumin-Papain der Fall ist. Aber dies reicht nicht zur Erklärung der Resistenz aus, man muß sie z. T. auch im Substrat selbst suchen. Wir haben eine Erklärung dafür (§§ 476a, 477a) darin gesucht, daß die Konfiguration der Ketten, die gegenseitige Verklammerung ihrer einzelnen Glieder, dem Enzymangriff an sich einen sehr erheblichen Widerstand entgegensetzt; daß aber die hohe Acidität, die für die Pepsinwirkung notwendig ist, durch die starke positive Aufladung der polaren Gruppen und deren gegenseitige Abstoßung sowohl die einzelnen Ketten selbst entfaltet, wie auch die „Bündel" in den Micellen auseinandertreibt.

Einen Angriff genuinen Kollagens zu einem nunmehr den normalen Proteinasen zugänglichen „Hydrokollagen", wie es auch durch schwache Säure oder Erhitzen auf 70° entsteht, durch ein Sekretferment der Larven der Fliege *Lucilia sericata* hat HOBSON **348)** gefunden; ob hier wirklich ein besonderes Enzym **Kollagenase** vorliegt, oder ob der ph von ca. 8,5 allein für das Bindegewebe-Kollagen zur Desaggregirung genügt, scheint mir noch nicht geklärt.

---

344) ***R. K. Anderson, Ch. J. Farmer,*** Enz. dig. of gastric mucin. Proc. Soc. Exp. Biol. New York, 32, 21 (1934); BPh **36**, 597. — 345) ***E. Abderhalden, W. Kröner,*** Abbau von Casein, Serumglobulin etc. Fermentforsch., **10**, 12 (1928). S.A. — 346) ***E. W. Cohn, A. White,*** Enz. hydrol. of raw etc. egg white. Jl. of Biol. Chem., **109**, 169 (1935). — 346a) ***M. Rigoni,*** Az. biol. di... proteine, Boll. Soc. Ital. Biol. **7**, 872 (1932). — 347) ***W. Graßmann,*** Neue Erg. auf dem Geb. der eiweißspalt. Enzyme. Collegium, **11**, 549 (1934). S.A. — 347a) ***A. Roncato,*** Dig. „in vitro" combin. pepto-tript. Boll. Soc. Ital. Biol., **3**, 558 (1928); Arch. di fis. **28**, 69 (1930) BPh **49**, 540, **55**, 530. — 348) ***R. P. Hobson,*** Enz. from blow-fly larvae, wh. dig. collagen etc. Biochem. Jl. **25**, 1458 (1931).

Resistenz gegen alle Peptidasen. Die allgemeine Bedeutung dieser Annahmen liegt in weitergehenden Folgerungen das wichtige Problem betreffend, weshalb alle Peptidasen trotz des allgemein gleichen Bauplans ohne jede Wirkung auf Proteine sind, wie nach COHNHEIM mit moderner Methodik gleichzeitig mit der Resistenz der Polypeptide gegen Proteinasen zuerst WALDSCHMIDT-LEITZ **349), 350)** nachwies. Dabei dürfen wir nach dem oben Gesagten die Protamine bei Seite lassen; und die alten Angaben über Angriff von Casein und Fibrin durch Erepsin sind widerlegt. Wir stehen vor der Wahl, nur die Kettenlänge als Ursache anzunehmen, wie dies bei den Carbohydrasen wahrscheinlich ist, oder sie eben in den Differenzen zu suchen, die in dem einfachen, nicht micellaren Bau der Polypeptide gegenüber diesen konfigurativ stabilisirten Ketten vorliegen, die durch Wechselwirkungen innerhalb der Ketten und zwischen den Ketten Formen annehmen, die den Peptidasen nicht zugänglich sind. Jedenfalls tritt hier der für die Peptidasen typische einfachste Fall nicht ein, daß sie an den freien Enden ansetzen können, je nachdem Aminogruppe oder Carboxyl, und so müssen denn auch — immer in Kombination mit der zweifellos stets mit in Betracht zu ziehenden Länge der Ketten — auch die Endglieder in den Proteinen so gebaut sein, daß sie den Peptidasen keinen Angriffspunkt mehr bieten. Das kann wieder z. T. auf der Endstellung von besonderen Aminosäuren beruhen, wie z. B. Resistenz von hauptsächlich aus Glycin (neben Leucin) bestehenden und am Carboxylende Glycin tragenden sehr hohen Peptiden gegen Carboxypolypeptidase **(350a)**, die aber durch Einführung von Tyrosin diese Resistenz verlieren. Es können aber auch diese Kettenenden wieder eine besondere Konfiguration haben; wenn man nicht sogar mit SHIBATA als Kettenende besondere Strukturen annehmen will, wie wir § 476 erörtert haben, nämlich Ringe. Jedenfalls trägt diese Tatsache, die Unangreifbarkeit der Endgruppen in den Proteinen durch Peptidasen, dazu bei, die Vorstellung zu verstärken, daß im Gegensatz zu den Peptidasen die Proteinasen überhaupt nicht an den Enden angreifen, sondern innerhalb der Ketten an polaren „Seitenketten" mit COOH, OH oder NH_2, an herausragenden Gruppen von Dicarbonsäuren, Tyrosin, Lysin, Arginin, Histidin (WALDSCHMIDT-LEITZ, sowie vor Allem LINDERSTRØM-LANG). Darauf kommen wir §§ 479a, 480 eingehender zurück.

b) Allgemeine Wirkung der Proteinasen*).

§ 478a. In dieser Hinsicht haben wir seit der Darstellung im H.W. einen Fortschritt von ganz großer und principieller Bedeutung zu verzeichnen, auf den wir bereits im Zusammenhang mit der wesentlich eben durch diese Entdeckung erfolgten neuen — eigentlich alten — Betrachtungsweise des Aufbaus der Proteine nachdrücklich hingewiesen haben. **Alle Proteinasen sind echte Hydrolasen**; desaggregirende Fermente, deren Wirkung ohne gleichzeitige Lösung von Strukturbindungen verläuft, gibt es nicht. Bei jeder Hydrolyse werden Peptidbindungen —CO—NH— gelöst, und es treten somit freie NH_2-Gruppen und freie Carboxyle auf. Darin stecken nun zwei sehr wichtige Aussagen, die in neuerer Zeit meist gleichzeitig näher erörtert sind, und die wir deshalb auch hier nicht trennen wollen.

---

*) Neueste Zusammenfassung GRASSMANN u. SCHNEIDER **351)**.

349) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck,*** Spez. Wirk. von Pankr.-Trypsin u. Pankr.-Erepsin. Zs. phys. Chem., **149**, 203 (1925). — 350) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner,*** Darmerepsin. Zs. phys. Chem., **151**, 31 (1926). — 350a) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter, W. Klein,*** Spez. von Pankreastrypsin. Ber. Chem. Ges., **61**, 299 (1928). — 351) ***W. Graßman, F. Schneider,*** Proteasen. Erg. Enzymf. **5**, 79. Leipzig 1936.

1) Das Auftreten freier Gruppen an sich ist nicht auf die tiefere Spaltung durch die Peptidasen beschränkt, bei deren Wirkung es ja selbstverständlich und von jeher angenommen ist, sondern es begleitet auch die Wirkung der reinen Proteinasen von Beginn an: es gibt keine irgendwie erheblich in Betracht kommende (s. u.) Desaggregirung ohne chemische Hydrolyse.

2) Wenn jegliche Hydrolyse durch echte Proteasen nur wahre Peptidbindungen löst, so muß das Verhältnis von freigesetztem Carboxyl zu freigesetzten Aminosäuren stets = 1 : 1 sein. Dieses Aequivalenzgesetz muß dann für die gesamte Eiweißspaltung durch Proteinasen und Peptidasen von Anfang bis zu Ende gelten. Sind beide Forderungen erfüllt, so ist damit erwiesen, daß es keinen rein desaggregirenden Zerfall in Grundkörper ohne Hydrolyse gibt, und weiterhin, daß die spaltbaren Proteine aus nichts anderem bestehen als aus normalen Peptidketten.

Es hat sich nun ergeben, daß die erste Forderung überall erfüllt ist, wenn man reine peptidasenfreie Proteinasen auf irgendwelche Proteine wirken läßt, mit Ausnahme einiger Zweifel für den allerersten Beginn. Hier stehen wir vor der unten näher zu beleuchtenden Frage, ob es eine gewisse reine Desaggregation als Vorbereitung für den ersten hydrolytischen Angriff gibt, oder ob nur die Meßmethoden nicht ausreichen, um eine gleichzeitig vorhandene Hydrolyse nachzuweisen. Für den Gesamtaspekt ist dies ohne Belang.

Die zweite Forderung, das **Aequivalenzgesetz**, ist nach Überwindung der methodischen Schwierigkeiten überall als erfüllt anzusehen. Und zwar bei der Proteinasenwirkung überall; bei der tieferen Spaltung gibt es eine nur scheinbare Ausnahme, nämlich bei der ereptischen Spaltung der im Prolinkern substituirten Peptide, bei deren Zerlegung zwar auch gleich viel basisches N wie Carboxyl entsteht, nur eben Imino-N des Prolinkerns anstatt NH_2. Diese Tatsache ordnet sich also ganz selbstverständlich in die allgemeine Regel ein und hat nur solange Unsicherheiten hervorgerufen, solange man eben diese Prolinpeptide und ihre Spaltbarkeit nicht kannte (Näheres s. u.). Dagegen ist kein Hinweis darauf zu finden, daß das Aequivalenzgesetz durch andere natürliche Ausnahmen gestört wird, etwa dadurch, daß zusätzliche Carboxyle einerseits (an etwa mit beiden COOH-Gruppen peptidisch gebundenen Dicarbonsäuren) frei werden, andererseits zusätzliche Guanidingruppen oder ε-Aminogruppen an Lysin. Die bereits § 476a gezogene Schlußfolgerung, daß alle diese Gruppen an den „Seitenketten" schon im Protein frei sind, wird also auch durch diese Beobachtungen gestützt. Rechnen wir also die Prolinbindung zu den normalen Peptidbindungen, so folgt aus dem Aequivalenzgesetz der fundamentale Satz: **bei der gesamten Proteinhydrolyse werden nur normale Peptidketten gespalten.**

Die so häufig gemessene **NH_3-Abspaltung** aus Proteinen durch Trypsinpräparate oder Pepsin hat mit der eigtl. Proteinasen-wirkung garnichts zu tun (vgl. § 462a). Im Roh-trypsin finden sich eben besondere NH_3 abspaltende Fermente (§ 443), und Pepsin wirkt an sich garnicht, es handelt sich um reine Säurewirkung (Hunter, l. c. 66, und Ragins **351a)**); s.a. den „Nachtrag" am Schluß von § 481.

Es muß dabei nur nochmals nachdrücklich darauf hingewiesen werden, daß damit nicht die Existenz einiger Anhydridbildungen ausgeschlossen werden kann, etwa der „Dioxopiperazine mit Seitenketten" (§ 476a); denn bei diesen wird ja — im Gegensatz zur früheren Theorie der kleinen Grundkörper — angenommen, daß ihre Ringe bei der enzymatischen Hydrolyse aufgespalten werden: sie sind also hier in Bezug auf beide Forderungen nicht von

351a) ***I. Kraus Ragins***, Rate of ammonia liberation in tryptic a. peptic dig. of casein. Proc. Soc. Exp. Biol., **30**, 452 (1933).

normalen offenen Peptidbindungen zu unterscheiden; im übrigen sind die Angaben über die Existenz und Spaltbarkeit solcher Gebilde bisher unbestätigt (l. c. 245a).

Im Anfang der Entwicklung dieser wichtigen Lehren gingen die Ziele noch etwas durcheinander. So hat — von älteren bereits im H.W. vermerkten dahinzielenden Befunden abgesehen — als einer der ersten das Aequivalenzgesetz (wenn auch nicht exakt) gefunden ROGOZIŃSKI **352)** beim Clupein. Dagegen hat STEUDEL **353)** zwar für die Pepsinwirkung die Tatsache der Hydrolyse festgestellt, aber das Aequivalenzgesetz völlig vermißt, was er aber z. T. selbst schon auf methodische Schwierigkeiten bezogen hat (s. u.).

Die Untersuchung der reinen Pepsinwirkung war aber für beide Fragen die Hauptsache. Erstens kann man hier die Peptidasenwirkung ganz sicher ausschalten, also die gefundene Aequivalenz ganz sicher auf eben die Proteinase beziehen, was bei Trypsin früher garnicht möglich war, und auch heute noch schwierig zu erreichen ist. Vor allem aber heftete sich an das Pepsin am festesten die Vorstellung des rein desaggregirenden Ferments, da es ja nur bis zu noch relativ größeren Bruchstücken spalten sollte.

Es war also entscheidend wichtig für beide zusammenhängenden Postulate, als WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **354)** und nach ihm FRANKEL **355)** zeigten, daß auch bei der reinen Pepsinwirkung keine bloße Desaggregirung, sondern eine Hydrolyse auftritt. Ferner erwiesen WALDSCHMIDT-LEITZ **356)**, WEBER **357)**, SØRENSEN **358)**, FELIX **359)**, ROCHE **359a)**, LINDERSTRØM-LANG **359b)** an den verschiedensten Proteinen einschließlich der Histone, daß die Pepsinwirkung auch das Aequivalenzgesetz streng befolgt, und zwar, daß α-Amino-N und Carboxyl aequivalent sind, also — wie bereits erwähnt — keine anderen Aminogruppen und auch keine zusätzlichen Carboxyle auftreten. Es werden auch vom Pepsin nur normale Peptidbindungen gespalten. CANNAN **360)** hat dies neuerdings mit Elektrotitration wieder bestätigt, ebenso MILLER **361)**; es gibt bei Lactalbumin für Pepsin keine andere Wirkung.

Dies gilt auch für die anderen Proteinasen. Da sich dabei neue Gesichtspunkte in dieser Hinsicht nicht ergeben haben, so sei nur ganz kurz die Literatur angeführt. Für „Trypsin" fanden das Aequivalenzgesetz oder wenigstens die sofortige rein hydrolytische Wirkung WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **362)**; für Papain WILLSTÄTTER c.s. **363)** und WALDSCHMIDT-LEITZ **364)**; für Hefenproteinase GRASSMANN und DYCKERHOFF **365)**. Dies nur die historische Entwicklung; die meisten dieser Arbeiten haben sich mit mehreren Enzymen befaßt, so die von WALDSCHMIDT-LEITZ, WEBER, FELIX, sodaß die Beobachtungen garnicht zu trennen sind. Das Endergebnis ist jedenfalls, daß für alle Proteine und alle Enzyme das Aequivalenzgesetz gilt. Es ist dann weiterhin noch u.a. von ROCHE **359a)** und CALVERY **366)** bestätigt worden.

---

352) ***F. Rogoziński,*** Einw. von proteol. Ferm. auf Clupein. Zs. phys. Chem., **79,** 398 (1912). — 353) ***H. Steudel, J. Ellinghaus, A. Gottschalk,*** Charakt. der Pepsinwirk. Zs. phys. Chem., **154,** 21, 198, **166,** 84 (1926/7). — 354) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Simons,*** Wirk.-Weise des Pepsins. Zs. phys. Chem., **156,** 114 (1926). — 355) ***M. Frankel,*** Zur Frage nach e. desaggreg. Wirks. d. Pepsins. Bioch. Zs., **207,** 53 (1929). — 356) ***E. Waldschmidt-Leitz, G. Künstner,*** Pepsinwirkung. Zs. phys. Chem., **171,** 70 (1927). S.A. — 357) ***H. H. Weber, H. Gesenius,*** Proteasen und proteol. Hemmungskörper. Bioch. Zs., **187,** 410 (1927). — 358) ***S. P. L. Sørensen, L. Katschioni-Walther, K. Linderstrøm-Lang,*** Peptic hydrol. C. R. Trav. Lab. Carlsb. **17,** Nr. 7; Zs. phys. Chem., **174,** 251 (1928). S.A. — 359) ***K. Felix, A. Harteneck,*** Aufbau des Histons aus Thymusdrüse. Zs. phys. Chem., **165,** 103 (1927). S.A.; ***K. Felix, A. Buchner,*** Spalt. des Oxyhaemoglobins mit Pepsin-HCl. Zs. phys. Chem. **171,** 276 (1927). — 359a) ***J. Roche,*** Recherches sur la globine. C. R. Trav. Lab. Carlsb., **18,** Nr. 4, S. 25, 40 (1929). — 359b) ***K. Linderstrøm-Lang,*** On peptic hydrol. C. R. Trav. Lab. Carlsb., **17,** Nr. 7 (1928). S.A. — 360) ***R. K. Cannan, E. Muntwyler,*** Act. of pepsin on gelatin. Biochem. Jl., **24,** 1012 (1930). — 361) ***L. Miller,*** Pept. hydrol. of lactalbumin. Jl. of Biol. Chem., **109,** LXVI (1935). — 362) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.,*** Spec. Wirk. von Pankreastrypsin etc. Zs. phys. Chem., **149,** 203, **156,** 99, **171,** 290 (1925/7); Ber. Chem. Ges., **62,** 2217 (1929). S.A. — 363) ***R. Willstätter, W. Graßmann, O. Ambros,*** Einheitl. einiger Pflanzenproteasen. Zs. phys. Chem., **152,** 164 (1925/6). — 364) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, W. Graßmann,*** Strukt. des Clupeins. Zs. phys. Chem., **156,** 68 (1926). S.A. — 365) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff,*** Proteinase etc. der Hefe. Zs. phys. Chem., **179,** 41 (1928). — 366) ***H. O. Calvery,*** Crystall. egg albumin. Jl. of Biol. Chem., **102,** 73 (1933). S.A.

Ausnahmen von diesem Aequivalenzgesetz treten in der Form auf, daß die Carboxyle überwiegen. Dies fand schon WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 354) für Gliadin und Zein. Die Ursache kann sein auch eine Lösung von Säureamid-bindungen (Asparagin, Glutamin), wenn die Fermente nicht rein sind; wichtiger ist aber in jedem Falle und auch für andere Proteine geltend, die arm an Amiden sind, und ebenso für reine Enzyme, die Prolin-peptidbindung, auf die bereits WALDSCHMIDT-LEITZ hingewiesen hat. Das erste Objekt, an dem bei dem Abbau durch Tryptase dieses Überwiegen des Carboxyls infolge des Prolingehaltes sicher festgestellt werden konnte, war das Clupein (WALDSCHMIDT-LEITZ c.s., l. c. 364, FELIX 367)). Dann hat es BERGMANN 368) bei der Hydrolyse des Glutins genauer untersucht, nachdem er vorher das Verhalten synthetischer Prolin-peptide geprüft hatte. Es zeigte sich, daß der tryptische Abbau genau das Aequivalent 1 : 1 ergab, hier werden also keine Prolin-Gruppen frei. Dies geschieht erst bei der Wirkung von Darmerepsin, hier wird COOH ohne aequivalentes NH_2 frei, d. h. hier werden Prolin-peptide gespalten. Daß man diese resistenten Prolingruppen mit den früheren „Antigruppen" in Beziehung setzen kann, ist § 478 erwähnt. Beim reinsten Ovalbumin fehlt nach CALVERY 366) diese Verschiebung; hier bleibt bis zum Totalabbau die Aequivalenz erhalten (vgl. unten), trotzdem Prolin und Oxyprolin vorhanden sind.

Wo sonst noch Abweichungen gefunden worden sind, sind es scheinbare Abweichungen, bedingt durch die Schwierigkeiten in der Methodik, deren Versagen immer dazu führt, daß mehr COOH gefunden wird. Erstens verhalten sich manche Aminosäuren bei der VAN SLYKE-Bestimmung abweichend, (z.B. STEUDEL, l. c. 353). Ferner wies WALDSCHMIDT-LEITZ darauf hin, daß man bei der Titration leicht zu viel Carboxyl nach der Hydrolyse findet, weil man am unveränderten Substrat die Eigenacidität nicht genügend erfaßt hat. Die modernen Methoden, so z.B. die Amino-N-Bestimmung nach LINDERSTRØM-LANG haben diese Mängel beseitigt (s. z. B. SØRENSEN, l. c. 358).

Trotz alledem hat die ganze so ungemein wichtige Beweisführung noch eine Lücke. Alle diese Beobachtungen über die Lösung von Peptidbindungen überhaupt und weiter über die Aequivalenz von COOH und NH_2 sind angestellt mit Versuchen von immerhin erheblicher Dauer. Was in den allerersten Stadien des Angriffs vor sich geht, ist damit nicht sicherzustellen; es ist dies auch mit den analytischen chemischen Methoden garnicht möglich, da diese dafür nicht hinreichend genau sind. Es ist also immerhin noch möglich, daß die nach viel empfindlicheren Methoden gefundenen Veränderungen physiko-chemischer Natur beim allerersten Angriff ohne nachweisbare Hydrolyse reell sind, d. h. einer reinen Desaggregation entsprechen: es ist aber ebensogut möglich, daß sie nicht reell sind, d. h. daß zwar bereits Hydrolyse erfolgt, aber analytisch noch nicht nachweisbar ist. Aber selbst wenn man mit der Wahrscheinlichkeit rechnen muß, daß die Wirkung der allerersten Zeit nur eine physikalisch-chemische der Desaggregirung ist, so muß doch nachdrücklich betont werden, daß dies etwas völlig Anderes ist, als die frühere Annahme, welche die Hauptwirkung der Proteinasen als eine alleinige Desaggregirung des Proteins in die Grundkörper ansah. Davon kann keine Rede mehr sein; es wäre zwar interessant und wichtig zu wissen, ob der Hydrolyse noch eine kurzdauernde Epoche der reinen Desaggregirung vorangeht, aber entscheidend ist das nicht mehr: weder für die Proteinstruktur noch für die Wirkung der Proteinasen.

In diesem Sinne sind also die Beobachtungen zu werten, die zuerst von RONA c.s. 369) gemacht worden sind. Sie fanden am Caseinogen eine Verkleinerung der Molate ohne Auftreten von Hydrolyse. Der Nachweis beruht im Auftreten von N-Verlusten bei der Dialyse durch Kollodiummembranen, die als Maß für die Adsorption der Abbauprodukte angesehen werden; da unverdautes Casein keine Verluste zeigt, wird angenommen, daß es in die Poren

---

367) ***K. Felix, A. Lang,*** Clupein. Zs. phys. Chem., **193**, 1 (1930). S.A. — 368) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich,*** Bindungsart des Prolins in der Gelatine. Ber. Chem. Ges., **65**, 1747 (1932). S.A. — 369) ***P. Rona, E. Mislowitzer,*** Ferm. Eiweißspaltung I—IV. Bioch. Zs., **196**, 197, **200**, 152, **202**, 453, **208**, 323 (1928/9).

nicht eindringen kann, und die N-Verluste einen Maßstab für die Desaggregation darstellen. Eine erste Phase, bei der nur Viscositätsänderung nachweisbar ist, beobachtete NORTHROP **371a)** bei dem Angriff seiner kristall. Proteinasen.

Eben daraufhin zielen auch Befunde von FARBER und WYNNE **371b)**; sie fanden mit Tryptase eine Abnahme des Eiweißes ohne Auftreten von Amino-N in den allerersten Stadien. Auf eine Desaggregation vor Eintritt der Hydrolyse deuten auch die Ergebnisse von SREENIVASAYA c.s. **372)** bei dem Vergleich der dilatometrischen Änderung der Versuchslösung mit der Bildung von Amino-N im Anfangsstadium der Einwirkung von Trypsin und Pepsin auf Casein und Gelatine. Bei Pepsin sind die Volumverminderungen viel höher als bei Trypsin (Caseinogen, Glutin), was auf ganz verschiedenen Angriff deutet. Bei Glutin geht Abnahme des Volums und Entstehung von Amino-N unter Pepsinwirkung ungefähr parallel. Auch bei nachgewiesener Hydrolyse nimmt nach RONA die Desaggregirung schneller zu als das Auftreten freier Endgruppen. (Das ist selbstverständlich und hat mit dem Kernproblem einer alleinigen Desaggregirung nichts zu tun). Trypsin desaggregirt stärker als Pepsin bei gleicher Hydrolyse. (Das könnte dafür sprechen, daß Tryptase die Bindungen mit den stärksten Nebenvalenzkräften auflöst). Serumalbumin wird durch Tryptase weder gespalten noch desaggregirt, wohl aber durch Pepsin. Ein weiterer Hinweis auf reine Desaggregirung ist das Ansteigen des osmot. Druckes bei ganz kurzer peptischer Spaltung von Caseinogen und Ovalbumin **(370)**. Dagegen ändert sich die optische Drehung bei Gelatine nicht, ohne daß gleichzeitig Hydrolyse nachweisbar ist (FRANKEL, l. c. 355). Beim Seidenfibroin fand WESSELY (*l. c. 8a, H.W. S. 812*) ebenfalls Verschwinden der kolloidalen Eigenschaften ohne Hydrolyse. Am Caseinogen beobachtete weiter GRABAR (l. c. 330), daß schon das Auflösen ganz weniger Bindungen zu einer tiefgreifenden Änderung des physiko-chemischen Verhaltens führt, ausgedrückt durch Verlust der Fällbarkeit. Dagegen fand HOLTER **371)** in den ersten Stadien der Pepsinverdauung strenge Parallelität zwischen Abnahme der Viscosität und hydrolytischer Spaltung, aber nur immer für ein Pepsin, die verschiedenen Fraktionen der Pepsine verhalten sich wegen des wechselnden Gehaltes an Gelatinase verschieden; darauf können wir erst bei Pepsin eingehen.

Die Abnahme der Teilchengröße durch Papain-HCN hat SVEDBERG **373)** direkt mit der Ultrazentrifuge an einheitlichem monodispersem Ovalbumin vom Molgewicht 34.500 untersucht. Papain ohne Aktivirung hat überhaupt keinen Einfluß auf die Sedimentirungskonstante und führt nicht zum Auftreten nicht zentrifugirbarer Abbauprodukte. Bei Papain-HCN (beim isoel. Punkt) ist der erste Akt das Auftreten einer Stufe von annähernd gleichem Molgewicht, aber erniedrigter Sedimentations-konstante (von 3,4 auf $2{,}7 \times 10^{-13}$) **(374)**. Dies ist auf das Auftreten einer Dyssymmetrie durch Lockerung, aber nicht Hydrolyse, einiger Bindungen zu beziehen. Daneben treten noch zentrifugirbare Abbauprodukte mit $0{,}6 \times 10^{-13}$ auf, sowie niedrige Abbaustufen **(374)**. Hier liegen also Anzeichen dafür vor, daß selbst in bisher als wahre Moleküle angesehenen Gebilden vor die Hydrolyse noch Desaggregirungserscheinungen als erstes Stadium vorgeschaltet sein können, was wieder zu Zweifeln Veranlassung gibt, ob nicht auch diese Proteine bereits im monodispersen Zustande bereits Micelle sind (vgl. S. 616).

Einen wichtigen Beitrag zu dieser Frage liefern noch die Berechnungen von HOLTER **375)** bei der Labwirkung auf Caseinogen, einem Vorgang, den man ja bisher stets als eine enzymatische Hydrolyse angesehen hat in dem Sinne, daß mit einer an sich geringfügigen Aufspaltung erhebliche Änderungen des physiko-chemischen Verhaltens in Bezug auf die Ausflockung der Calciumsalze („Caseine") einhergehen. HOLTER berechnet nun unter der Annahme eines Molgewichtes von 375.000, daß Lösung einer Peptidbindung bei der Titration der Aminogruppe 0,005 cm³ n/10 HCl ergeben würde, und daß man allenfalls gerade noch die Lösung von zwei Bindungen nachweisen kann. Unter gewissen Bedingungen (hohe $CaCl_2$-Konzentration) tritt nun die Labwirkung so schnell ein, daß man an die Fehlergrenze herankommt und es

370) ***P. Rona, H. A. Oelkers,*** Ferm. Eiweißspalt. V. Bioch. Zs., **217**, 50 (1930). — 371) ***H. Holter c.s.,*** Pepsin. Zs. phys. Chem., **196**, 1 (1931), **206**, 85 (1932). — 371a) ***J. H. Northrop, M. Kunitz,*** Cryst. trypsin III. Jl. of gen. Phys. **16**, 313 (1932) S.A. — 371b) ***L. Farber, A. M. Wynne,*** Stud. on pancreatic proteinase. Biochem. Jl., **29**, 2313 (1935). — 372) ***M. Sreenivasaya c.s.,*** Dilatometr. stud. in the proteoclast. degrad. of prot. Biochem. Jl., **28**, 351, 1219 (1934); Curr. Sci., **2**, 49 (1933/4). — 373) ***The Svedberg, I. B. Erikson,*** Abbau des Ovalbumin-mol. durch Papain. Bioch. Zs., **258**, 1 (1933). — 374) ***The Svedberg, I. B. Erikson,*** Ultracentr. stud. of the act. of papain on ovalbumin. Jl. Amer. Chem. Soc., **56**, 409 (1934). — 375) ***H. Holter,*** Labwirkung. Bioch. Zs., **255**, 160 (1932).

offen bleiben muß, ob hier überhaupt noch 1—2 Bindungen gelöst sind, oder ob tatsächlich nur eine Desaggregation erfolgt. Dabei ist es für unsere Diskussion hier nebensächlich, daß dieser Vorgang wahrscheinlich nur an einer Komponente des Caseinogens erfolgt, die als „Schutzkolloid" das ganze System stabilisirt und bei der Labwirkung zerstört wird; darauf kommen wir erst bei der Chymase zurück. In jedem Falle handelt es sich um die Frage, ob es reine Aggregation in den Anfangsstadien gibt. Nach dem Gesagten ist es also nicht auszuschließen, vgl. auch LINDERSTRØM-LANG (l. c. 197, S. 436). Dieselbe Frage erhebt sich bei der Gelatinase (§ 545).

c) Wirkung der verschiedenen Proteinasen.

§ 478b. Wir brauchen nicht weiter zu betonen, daß wir das in dieser Überschrift gegebene Postulat nicht erfüllen können: Die „Wirkung" der einzelnen Proteinasen gegeneinander abzuwägen, sind wir noch nicht imstande und können daran garnicht denken, so lange die Vorbedingungen nicht erfüllt sind: nämlich die Kenntnis vom Aufbau der Substrate und vom Modus ihrer Spaltung überhaupt. Andererseits haben wir doch gewisse Fortschritte gemacht. Wir brauchen uns nicht mehr mit den Diskussionen des H.W. (s. z. B. S. 840) zu befassen, ob Pepsin oder Trypsin freie Aminosäuren abspalten. Wir können von dem Grundsatz ausgehen, daß alle Proteinasen nur Polypeptide in dem erweiterten Sinne bilden, daß wir die zur Genüge behandelten Fragen, ob „Kyrine" und „Peptone" auch nur Gemische normaler Peptide sind oder noch andere Strukturen enthalten, ganz zurückstellen. Daß Pepsin keine freien Aminosäuren bildet, hat WALDSCHMIDT-LEITZ **376)** (l. c. 356) nochmals sichergestellt, und ABDERHALDEN **377)** hat ein Hexapeptid aus Alanin wiederum gegen Pepsin resistent gefunden *). Bei der Wirkung jeder einzelnen Proteinase entstehen also in diesem Sinne Gemische von Polypeptiden, und die Fragestellung richtet sich auf zwei Probleme, die aber wie alles auf diesem Gebiet nicht säuberlich zu trennen sind, sondern durcheinandergehen.

Die erste Frage ist die, ob eine Gruppe tiefer spaltet als die andere. Das will sagen, ob man genügend Gründe hat anzunehmen, daß etwa Pepsin das Eiweißmolekül nur in wenige große Stücke zerschlägt und dann aufhört zu wirken, während etwa die Tryptase von vornherein schon an vielen Stellen angreift und gleich von vornherein das Molekül in eine Anzahl kleinerer Stücke zerschlägt.

Die zweite Frage ist die, ob von vornherein der Angriffspunkt der drei Typen von Proteinasen ein verschiedener ist, sodaß eben auch die Art der Spaltung eine andere ist. Es ist ersichtlich, daß die Lösung dieser zweiten Frage unter Umständen automatisch auch die Lösung der ersten mit erbringen könnte.

Setzen wir einmal ganz schematisch den Fall — wir werden später sehen, daß er nicht ganz aus der Luft gegriffen ist —, daß etwa Tryptase eine specifische Affinität zum Tyrosin hat, d. h. zu dessen phenolischer OH-Gruppe in der Seitenkette, oder, allgemeiner gesagt, zu negativ geladenen Gruppen, Pepsin aber etwa zum Lysin, d. h. zu positiven Seitenketten, und daß andere Momente auszuschließen wären; und setzen wir weiter den (recht wahrscheinlichen) Fall, daß diesem „Angreifen" eine Spaltung einer nahe benachbarten Peptidbindung

*) Allen bisherigen Angaben zuwider gibt CALVERY **378)**, **378a)** in zwei kurzen Mitteilungen an, daß durch Pepsin aus Eialbumin kleine Mengen freier Aminosäuren entstehen sollen, die er durch Dialyse nachgewiesen haben will. Nachweis von Tyrosin und Tryptophan. Näh. § 547.

376) ***E. Waldschmidt-Leitz, G. Künstner***, Pepsinwirkung. Zs. phys. Chem., **171**, 70 (1927). — 377) ***E. Abderhalden, W. Gohdes***, Verh. von aus 1 (+)-Alanin aufgeb. Polypept. etc. Fermentforsch., **13**, 52, 62 (1931). — 378) ***H. O. Calvery, E. D. Schock***, Pept. hydrol. of egg albumin. Jl. of Biol. Chem., **109**, XVI (1935). — 378a) ***H. O. Calvery***, Fract. of peptic hydrol. prod. Jl. of Biol. Chem., **112**, 171 (1935).

folgt, so wäre die Frage, ob kurze oder lange Ketten entstehen, einfach eine Frage der Struktur der Kette selbst.

Denn wenn dann eine Kette von sagen wir 100 Peptidbindungen in gleichmäßiger Verteilung 10 saure Seitenketten und nur 5 basische hätte, so würden durch Pepsin Bruchstücke von 20 Gliedern entstehen, durch Trypsin solche von 10. Natürlich ist diese Schematisirung sehr roh und sicherlich im Einzelnen nicht richtig, denn sie vernachlässigt bewußt alle die Schwierigkeiten der Struktur, die wir geschildert haben, und vernachlässigt weiter die Massirung gleicher Aminosäuren in naher Nachbarschaft, wie wir sie bezgl. des Serins § 477a beim Caseinogen, und bezgl. des Arginins beim Clupein kennen gelernt haben. Aber um eine Möglichkeit zu schematisiren, mag dieses Bild hingehen.

Es kann nämlich auch ganz anders sein. So neigt man seit langer Zeit dazu anzunehmen, daß Pepsin „weniger tief" spaltet als Tryptase. Das kann bedeuten, daß tatsächlich noch größere Bruchstücke übrig bleiben; es kann aber auch bedeuten, daß Ketten von etwa gleicher Ausdehnung wie bei der Tryptase entstehen, daß aber die Art der Spaltung und damit die Qualität dieser Ketten eine andere ist; in dem Sinne nämlich, daß Pepsin im Gegensatz zur Tryptase die Stellen hoher Nebenvalenzkräfte schont, sodaß noch starke Associationen an sich kürzerer Ketten nachweisbar sind, wie dies besonders für die „Albumosen" noch hemikolloider Natur zu gelten scheint. Dafür könnte man z. B. die Beobachtungen von Rona c.s. (l. c. 369) heranziehen. Wenn aber Pepsin wirklich nur größere Bruchstücke übrig läßt, so würde dies im Zusammenhang mit den § 478 behandelten Resistenzproblemen bedeuten, daß es in erster Linie dazu berufen ist, einige wenige besonders charakteristische Bindungen, seien es normale Peptidbindungen oder andere, zu zerschlagen, auf denen die Eigenart des Proteins beruht. Dafür bietet sich z. B. die Cystingruppe, denn alle Peptone, auch die des Keratins, sind frei von Schwefel. Auch die tyrosinhaltigen Gruppen werden häufig sehr schnell durch Pepsin herausgeschlagen, wie längst bekannt, und neuerdings wieder an Casein und Insulin bestätigt ist (s. u., l. c. 398, 400). Oder Pepsin löst andere noch unbekannte Bindungen im genuinen Protein, die der Tryptase unzugänglich sind, so beim Serumalbumin. Ungefähr auf dasselbe kommt es hinaus, wenn man sich nach § 477a vorstellt, daß Pepsin aus Caseinogen eine P-freie und eine noch (theoretisch) das gesamte P enthaltende Gruppe, das Paranuclein, herausschlägt, die noch hochmolekular und unlöslich ist, dann freilich auch vom Pepsin selbst langsam weiter abgebaut wird. Andererseits lassen die Ergebnisse der Spaltung von Clupein durch Tryptase auf eine ganz besondere Affinität zur Peptidbindung zwischen 2 Argininen schließen (l. c. 197, 245a), s. a. u.

Es kann aber weiter auch der Umstand entscheidend sein, daß Pepsin bei einem ganz abnorm sauren ph untersucht werden muß. Es ist durchaus diskutirbar, daß bei dieser stark positiven Aufladung die zunächst entstehenden Bruchstücke jeglicher Art chemisch so stabilisirt werden, daß sie nicht weiter katalytisch zerlegt werden können, und daß vielleicht einzig und allein die Tatsache, daß Tryptase bei schwach alkalischer Reaktion wirkt, eine erhebliche Verstärkung der Zerfallsneigung durch irgendwelche Umlagerungen an den Peptidgruppen verursacht (§ 479a). Daß noch stärkere Acidität oder die gleiche beim Erhitzen wieder spaltend wirkt, braucht kein absoluter Grund gegen diese Auslegung zu sein.

Auch die Papainasen spalten nach der allgemeinen Annahme in nicht aktivirtem Zustande nur „wenig tief"; hier tritt nun noch der sonderbare Umstand hinzu, daß nicht aktivirte Papainasen „Peptone" überhaupt nicht angreifen, dies aber nach Aktivirung leisten können. Das läßt nun ganz grundsätzlich die Frage offen, ob nicht die Tiefspaltung durch Papain-HCN etc. einfach darauf beruht, daß hier garnicht die Proteinase durch Aktivirung ihre Specifität erweitert, sondern ein zweites Enzym, eine Art **„Peptonase"** die vorher völlig inaktiv war, manifest wird. Dies ist nun nach neuesten Ergebnissen von Bergmann **379)** tatsächlich der Fall. Papain enthält in jedem Fall ein ganz besonderes, durch fraktionirte Zerstörung nachweisbares Enzym, die Papain-Polypeptidase, die nach ihrer Aktivirung mit HCN und dergl. nun definirte Substrate peptidähnlicher Natur, aber keine echten Polypeptide

379) ***M. Bergmann, W. Ross,*** Proteol. enz. VIII. Jl. of Biol. Chem., **111,** 659 (1935).

spaltet. Sie ist vielmehr eingestellt nur auf zwei benachbarte Säureamid-bindungen (§ 479a). Ob das Enzym freilich mit derjenigen Komponente des Papains identisch ist, die nach der Aktivirung Peptone spaltet, also die gesuchte „Peptonase" ist, ist noch nicht erwiesen; aber es ist nach der ganzen Sachlage nicht unwahrscheinlich. Das würde also zu ganz neuen Erwägungen über die Struktur der Peptone führen müssen, da diese dann nach der Spezialwirkung nicht einfach „echte" Polypeptide sein könnten. Der Befund gibt aber ferner erneute Veranlassung zu ähnlichen Erwägungen betr. des Begriffes der „Tryptase". Auch wenn man unter Tryptase nur die aus dem „Trypsin" herausgeschälte, von Carboxy-polypeptidasen (einschl. Protaminase) befreite und durch Kinase oder sonstwie voll aktivirte, bisher als wirkungsrein betrachtete Proteinase versteht, so haben wir doch durchaus noch keine Gewißheit, daß sich in ihr nicht doch noch ganz specielle Sonderenzyme für bereits abgebaute Ketten befinden, eben solche, die ich bereits in der Einführung S. 619 als hypothetische „Peptonasen" bezeichnet habe; denn auch reinste Tryptase greift nach NORTHROP (l. c. 30) zwar Peptone an, aber kein Polypeptid. Und dann könnte der ganze Unterschied in der „Tiefe" des Abbaus zwischen Pepsin einerseits, Tryptase andererseits darauf zurückzuführen sein, daß Pepsin eben wirklich eine reine Proteinase ist, Tryptase aber noch ein System mehrerer Stufen-fermente.

Das mag sich nun so oder anders verhalten; man könnte noch verschiedene andere Möglichkeiten schematisiren, und wir werden am Schluß dieses Kapitels nach Einsichtnahme in alle Einzelheiten die heute wirklich verfochtenen Ansichten zusammenstellen. Sichere Kenntnisse haben wir auch über die verschiedene Wirkung der Proteinasen nicht.

Was hier zu schildern ist, sind Versuche, quantitativ an den Leitlinien der verschiedenen **Aufteilung der einzelnen N-Fraktionen** (s. bei Methodik § 492) festzustellen, wie sich die verschiedenen Proteine verhalten, wenn man die drei Proteinasen jede einzeln möglichst zu Ende wirken läßt und dann eine andere einsetzt, und weiterhin nach Ablauf jeder Proteinase-wirkung verschiedene Peptidasen einsetzt, um aus deren Wirkung Feststellungen dahingehend zu treffen, was denn die einzelne Proteinase an abbaureifen Polypeptiden erzeugt hat.

Vorher noch zwei grundsätzliche Dinge. Erstens muß gesagt werden, daß diese Versuche methodisch sehr schwierig sind, besonders weil sich durch das — ja im Versuchsplan liegende — Erhaltenbleiben der jeweiligen Spaltprodukte Hemmungserscheinungen einstellen, die das Zahlenbild stark trüben können, insofern als sich falsche Gleichgewichte einstellen; dazu s. z. B. WEBER und GESENIUS (l. c. 357) und die weiteren modernen Arbeiten unten.

Zweitens muß man sich darüber klar sein, wieviele Gruppen von Proteinasen es wirklich gibt, die man gegen einander abzuwerten hat. Es hat sich nun gerade durch diese Versuche herausgestellt, daß es in dieser Hinsicht, der Stufenwirkung, tatsächlich nur drei gibt — von Bakterienproteasen abgesehen —; nämlich außer Pepsinasen und Tryptasen nur noch Papainasen. Alle Glieder dieser Gruppe: Papain und Ähnliche, Kathepsine und die Enzyme der Kryptogamen und Avertebraten wirken stufenmäßig gleich. Einen weiteren Abbau etwa durch Kathepsin oder Hefenproteinase nach Papain oder umgekehrt gibt es nicht (GRASSMANN, l. c. 365, WALDSCHMIDT-LEITZ 380)).

Diese Versuche gehen auf die lange bekannte Tatsache zurück, daß „Trypsin" (meist) noch intensiv weiter wirkt, wenn die Pepsin-wirkung sich bei einer bestimmten Stufe eines „Peptons" stabilisirt hat. Diese älteren Versuche (H.W. S. 948) besagen nichts mehr, weil

380) ***Waldschmidt-Leitz c.s.***, Proteol. Syst. in tier. Organen. Zs. phys. Chem., **188**, 17 (44) (1930). S.A.

in diesem „Trypsin" eben auch noch die Peptidasen mitgewirkt haben. Wichtig wurden sie erst, als man sie mit völlig von den bisher bekannten Peptidasen befreiten Tryptasen wiederholt hat, und auch dann noch Wirkung auf die pepsinverdauten Proteine ebensowohl in den Gemischen fand, wie auf die vorher isolirten Pepsinpeptone, die zwar z.T. auch schon durch Polypeptidasen, z. T. aber nur durch Tryptase spaltbar sind, d. h. durch Proteinase mit dem oben erwähnten Vorbehalt, daß diese noch weitere unbekannte Stufenenzyme enthält; darauf kommen wir nun nicht mehr zurück. Die Zerlegung von isolirten Pepsin-Peptonen durch reine Tryptase haben z. B. WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR **381**) festgestellt. Auch Papain-HCN (WILLSTÄTTER, l. c. 363), sowie Kathepsin und Hefenproteinase greifen Pepsin-peptone an (WILLSTÄTTER und GRASSMANN **382**), **383**), WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **384**)).

Damit war also zunächst einmal sichergestellt, daß Tryptase und die Papainasen noch spaltbare Gruppen vorfinden, wenn die Pepsinspaltung zum Stillstand gekommen ist. Dieser Punkt kann sehr verschieden liegen, so geben z. B. als einen sozusagen Grenzfall TORBET und BRADLEY **385**) an, daß bei Caseinogen 10 % des N in einem unlöslichen Rückstand verbleiben (Weitere Angaben s. u. bei Histonen und Ovalbumin). Daß dies aber nicht immer gilt, daß vielmehr bei Ovalbumin Tryptase nach Pepsin nicht wirkt, werden wir unten ersehen. Aber schon ältere Beobachtungen zeigten, daß auch das Umgekehrte der Fall ist, daß nämlich nach der Wirkung von Tryptase auch Pepsin noch weiter wirkt (H.W.S. 840, 948). Auch hier bildet Ovalbumin eine Ausnahme (s. u.).

Diese zerstreuten und mit unreinen Enzympräparaten ausgeführten Versuche über die Stufenwirkungen verschiedener Enzyme sind dann, besonders von WALDSCHMIDT-LEITZ, systematisirt worden, und zwar in Anbetracht der allzu verwickelten Verhältnisse bei den echten Proteinen zunächst an Protaminen und Histonen.

Ein erster Versuch am Caseinogen (**386**) hat noch keine wesentlichen Ergebnisse gebracht. Er scheint zu zeigen, daß hier nach erschöpfender Wirkung von Trypsin + Erepsin Pepsin kaum noch wirkt, was im übrigen älteren Beobachtungen von HENRIQUEZ (H.W.S. 948, *l. c. 485*) entspricht. Gerade beim Caseinogen, das ja tatsächlich besonders leicht durch Tryptase angegriffen wird, scheint also die Kombination Tryptase + Erepsin praktisch völlig zu spalten. „Trypsin" allein macht als Endprodukt 27 % N frei; jedoch enthielt dieses natürlich noch die Carboxy-polypeptidase. Ein Versuch an diesem Protein mit reiner Tryptase, dann Pepsin, scheint nicht vorzuliegen.

Die ersten systematischen Versuche haben dann WALDSCHMIDT-LEITZ, SCHÄFFNER und GRASSMANN (l. c. 364) am Clupein vorgenommen. Auch diese Versuche sind nicht in allen Punkten zahlenmäßig endgültig wegen methodischer Bedenken, z. B. Einstellung falscher Gleichgewichte (WEBER, l. c. 357, u.a.) (s. l. c. 197, S. 449). Aber grundsätzlich können sie jedenfalls acceptirt werden. Es seien hier unter Weglassung der Zahlenbelege nur die Endergebnisse der „Leistung" der verschiedenen Enzyme angeführt. „Trypsin" ist (zunächst) = nicht aktivirte Carboxypolypeptidase zu setzen (s. u.). Totalspaltung ergab (Formoltitration) 5,0 cm³ 0,2n COOH; Leistungseinheit 0,9 cm³ 0,2n COOH.

Eine eingehende Kritik dieser ersten Arbeit, die natürlich außer den schon angedeuteten Bedenken noch die Unsicherheit der Enzymdefinitionen des Jahres 1926 gegen sich hat, s. l. c. 197. Die Untersuchungen an anderen Protaminen (**387**) haben gezeigt, daß sich Sturin (Acipenserin) ganz anders verhält, da es von Trypsin nicht angegriffen wird, und daß Scom-

---

381) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Proteinase u. Carboxy-polyp. aus Pankr. Ber. Chem. Ges., **62**, 2217 (1929). — 382) ***R. Willstätter, W. Graßmann,*** Proteasen der Hefe. Zs. phys. Chem., **153**, 250 (1926). — 383) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff,*** Proteinase u. Polyp. der Hefe. Zs. phys. Chem., **179**, 41; Ber. Chem. Ges., **61**, 656 (1928). S.A. — 384) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.,*** Dipeptidase etc. aus Darmschleimh. Ber. Chem. Ges., **62**, 956, **63**, 1203; Zs. phys. Chem., **188**, 17 (1930). — 385) ***V. Torbet, H. C. Bradley,*** Stud. of pept. activ. Jl. of Biol. Chem., **92**, LXXVII (1931). — 386) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Simons,*** Über die enzymat. Hydrolyse des Caseins. Zs. phys. Chem. **156**, 99 (1926). — 387) ***E. Waldschmidt-Leitz, Th. Kollmann,*** Enzymat. Spaltbarkeit der Protamine. Zs. phys. Chem., **166**, 262 (1927). S.A.

Reihenfolge	Leistung
Trypsin	1,0
Trypsin-Kinase	3,0
Darmerepsin	1,0
	Sa. 5,0
Trypsin	1
Darmerepsin	1
Trypsin-Kinase	1
Darmerepsin	1,9
	Sa. 4,9
Trypsin-Kinase	3,5
Darmerepsin	1,7
	Sa. 5,2
Trypsin	1,0
Hefeerepsin (Dipeptidase)	0,0
Papain-HCN	1
Darmerepsin	2,4

Reihenfolge	Leistung
Trypsin	1
Papain-HCN	1
Trypsin-Kinase	1,2
Darmerepsin	1,9
	Sa. 5,1
Trypsin	1
Papain-HCN	1
Darmerepsin	1,5
Trypsin-Kinase	0,8
Darmerepsin	0,6
	Sa. 4,9
Papain-HCN	1
Trypsin	0,9
Trypsin-Kinase	1,8
Darmerepsin	1,3
	Sa. 5,0

brin bei der Stufenwirkung andere Zahlen ergibt. Eine weitere Arbeit (**388**) bringt in der Hauptsache den Nachweis der Bildung von freiem Arginin, der nun zu weiteren wichtigen Folgerungen geführt hat.

Denn in einer auch sonst bedeutungsvollen Arbeit haben Waldschmidt-Leitz c.s. **388**) den Nachweis geführt, daß „Trypsin" außer der sozusagen allgemeinen Carboxypolypeptidase noch die specielle Arginin-carboxy-polypeptidase einschließt, die Protaminase, die nur vom Carboxyl-ende des Clupeins freies Arginin abspaltet. Unter Benutzung eines einheitlicheren Clupeins (der schwer löslichen Fraktion) finden sie, daß dieses abgespaltene Arginin 20 % des Gesamtarginins beträgt. Für jedes abgespaltene Arginin wird genau 1 COOH frei. Es muß also das Arginin frei am Ende stehen; denn bei Herausschlagung eines Arginins aus der Mitte müßten mehr Carboxyle frei werden; außer wenn man Kombinationen von mehr als 2 Argininen hintereinander annehmen wollte, was aus anderen Gründen unwahrscheinlich ist. Die Beobachtung von Felix **389**), daß auch Arginase auf Clupein wirkt, also ein freies Arginin vorfinden muß, ist von Waldschmidt-Leitz (l. c. 245a) nicht bestätigt worden. Die 20 % sind nach Waldschmidt-Leitz 2 Arginine; die weitere Ausnutzung dieser Abbauergebnisse für die Struktur des Clupeins und Salmins ist bereits § 477 berichtet.

Mit dieser ganz speciellen Protaminase-wirkung ist ein neues Moment der Unsicherheit in die Erklärung der Stufenwirkung der Proteinasen hineingekommen; ganz abgesehen davon, daß die Protamine überhaupt nicht recht geeignete Substrate für diese Art von Untersuchungen sind, da sie ja im Gegensatz zu den echten Proteinen eben von Carboxy-polypeptidasen („Tryp-

388) ***E. Waldschmidt-Leitz, F. Ziegler, A. Schäffner, L. Weil,*** Protaminase u. die Prod. ihrer Einw. auf Clupein u. Salmin. Zs. phys. Chem., **197**, 219 (1931). — 389) ***K. Felix, K. Dirr, A. Hoff,*** Clupein VI. Zs. phys. Chem., **212**, 50 (1932).

sin") angegriffen werden. So sei denn nur bemerkt, daß bei der Anwendung von Trypsin + Kinase bereits eine kombinirte Wirkung der Protaminase und einer wahren Proteinase erfolgt, was die hohe Leistung bei WALDSCHMIDT-LEITZ (s. Tabelle) erklärt, sowie den Befund von FELIX 390), daß Trypsin-kinase bereits die Hälfte des Gesamtarginins freimacht, und zwar in einer der Arginase zugänglichen Form, also als Kombination von freiem und gebundenem Arginin (über die nachgewiesenen Dipeptide s. § 477); Erepsin macht dann den Rest frei.

Sehr viel Schlüsse im Einzelnen betr. die Angriffspunkte der Enzyme über die spezifische Protaminasenwirkung hinaus gestatten diese Ergebnisse nicht. Generell zeigt sich, daß schon „Trypsin" über die Protaminasenwirkung hinaus bereits in der Mitte angreifen muß, um einen Angriffspunkt für die Peptidasen des Darmerepsins zu schaffen; wahrscheinlich durch eine geringfügige Aktivirung, es greift dann zwischen 2 Argininen an. Ähnlich muß Papain-HCN wirken, das nach Protaminase wirkt, aber auch vor ihr, und nach dessen Wirkung auch bereits Darmerepsin angreift.

Das wichtigste Allgemeinergebnis ist Folgendes: gerade der Umstand, daß an diesem Substrat sowohl eine Peptidase, die Protaminase, wie auch echte Proteinasen primär angreifen, und in ganz verschiedener Weise, spricht dafür, daß deren Ansatzpunkt eben von vornherein verschieden ist. Und da eben die Protaminase, wie alle Peptidasen, an einem Kettenende angreift, so liegt der Gedanke nahe, daß die Proteinasen hier in der Kettenmitte angreifen, und zwar Tryptase zunächst nach LINDERSTRØM-LANG (l. c. 197) zwischen 2 Argininen. Er überträgt diesen Gedanken dann auf die Tryptase-wirkung überhaupt. Die Spaltung des Clupeins zwischen jedesmal 2 Argininen hat WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 245a) sichergestellt.

LINDERSTRØM-LANG schließt daran Berechnungen dahingehend, daß das Auftreten von Dipeptiden bei der tryptischen Spaltung (ohne Aminopolypeptidase) den Abbau vom Carboxyl-ende her ausschließt. Das Molekül ist zu groß, und die freiwerdenden Carboxyle sind zu gering an Zahl, als daß die von FELIX gefundenen Dipeptide der letzte Rest der Kette am Amino-ende sein könnten, und besonders die Bildung von Arginyl-arginin macht das beinahe unmöglich, da ja kein solches Dipeptid an diesem Ende steht. Alleiniger Abbau vom Ende her könnte höchstens zu Pentapeptiden führen. Nur wenn sofort 1—2 Innenbindungen gelöst werden, ist das Auftreten von Dipeptiden zu erklären. Wir werden auf diese ganz grundsätzlich wichtige Deutung im Schlußwort zu diesem Kapitel zurückkommen. Ein mehr ins Einzelne gehendes Abbauschema von LINDERSTRØM-LANG ist nach seiner eigenen Angabe durch die geänderte Auffassung der Clupeinstruktur als überholt zu betrachten.

Weitere Untersuchungen in dieser Hinsicht haben WALDSCHMIDT-LEITZ und KÜNSTNER 391) am Histon aus Thymus angestellt. Das Schema ist hier dadurch erweitert, daß nun auch Pepsin herangezogen werden kann, sodaß die Bedingungen denen der eigentlichen Proteine näherrücken; dem entspricht, daß „Trypsin", d. h. Carboxy-polypeptidasen, und Erepsin nicht angreifen. Das Histon verhält sich also enzymtypisch wie ein Protein. Als wichtigstes Ergebnis stellt sich dar, daß die einzelnen „Leistungen" stets ganze Vielfache von 10 sind, nur Darmerepsin bleibt zurück. Die Grenzen sind totale Aufspaltung durch aktivirtes Pancreasextract, also Tryptase + sämtliche Peptidasen, und nur 10 % durch Pepsin; Papain-HCN allein spaltet zu 30 %. Über die Stufenreaktionen einige Auszüge aus den Tabellen (S. 683).

Dipeptidase aus Hefe wirkt weder nach Pepsin, noch nach Pepsin + Trypsin, noch nach Papain + Papain-HCN; Dipeptide werden also nicht gebildet. Sehr wichtig ist der Befund, daß nach Pepsin zwar Darmerepsin schon recht erheblich wirkt, dann aber doch noch Trypsin-kinase, also wohl aktivirte Carboxy-polypeptidase; und dann wirkt wieder Darmerepsin, also Aminopolypeptidasen und Dipeptidasen. Mit reiner Tryptase nach Pepsin und

---

390) *K. Felix c.s.*, Clupein II, III. Zs. phys. Chem., **193**, 1, 205, 83 (1930/1). S.A. — 391) ***E. Waldschmidt-Leitz, G. Künstner***, Pepsinwirkung. Zs. phys. Chem., **171**, 70 (1927); Frakt. enz. Hydrol. des Histons. Zs. phys. Chem., **171**, 290 (1927).

Reihenfolge	Leistung	Reihenfolge	Leistung
Pepsin	10	Pepsin	10
Trypsin	10	Papain-HCN	10
Trypsin-kinase	39	Darmerepsin	41
Darmerepsin	35	Trypsin-kinase	10
		Darmerepsin	20
	Sa. 94		Sa. 91
Pepsin	10		
Darmerepsin	20	Papain	10
Trypsin-kinase	30	Papain-HCN	20
Darmerepsin	35		
	Sa. 95	Pepsin	10
		Papain	0
Pepsin	10		
Darmerepsin	20	Trypsin-kinase	60
Trypsin-kinase	30	Darmerepsin	36
	abgebrochen		Sa. 96

Darmerepsin liegen noch keine Versuche vor, die natürlich ganz besonders wichtig wären im Hinblick auf die Möglichkeit, daß trotz Pepsin + Erepsin vielleicht noch ein enzymtypisch als „Protein" zu betrachtender Rest vorhanden wäre, wie ja auch sonst „Peptone" noch von Tryptase angegriffen werden. Sehr interessant ist endlich, daß Papain genau wie Pepsin wirkt: 10 % an sich und nach Pepsin Null, während Papain-HCN sich anders verhält: nach Pepsin 10, nach Papain 20. Das ist im Einzelnen noch nicht zu deuten.

Für andere Proteine liegt nicht viel verwertbares Material vor; meist sind nur eben verschiedene Enzyme im Hinblick auf die verschiedenen Abbauprodukte geprüft worden; diese Arbeiten z. B. am Caseinogen (Rimington, Holter, Stirling und Wishart etc.) haben wir § 477a besprochen. So sei nur daran erinnert, daß hier ein sehr charakteristischer Unterschied zwischen peptischem und tryptischem Abbau darin zu erblicken ist, daß Pepsin die maskirte Serin-phosphorsäure nicht soweit freilegt, daß Phosphatase eingreifen kann, wohl aber Trypsin; ferner hinzugefügt, daß nach Holter **392)** die Angreifbarkeit der einzelnen Fractionen des Caseinogens durch Pepsin symbat mit ihrem P-Gehalt ansteigt. Es scheint sich also der peptische Angriff (viscosimetrisch gemessen) zunächst auf den Phosphorkern zu richten. Hier ist noch zu ergänzen, daß Abderhalden **393)** mehrere Proteine vergleichend geprüft hat. Bei Casein

392) ***H. Holter, K. Linderstrøm-Lang, I.B. Funder***, Pept. Abbau des Caseins. Zs. phys. Chem., **206**, 85 (107) (1932) und (engl.). C.R. Trav. Lab. Carlsb., **19**, Nr. 10, S. 26 (1933). — 393) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Ferm. Abbau einiger Proteine etc. Fermentforsch., **11**, 92 (1929).

wirkte am besten Pepsin und dann Erepsin, jedoch wirkt dann noch Trypsin-kinase (Carboxypolypeptidase nicht abgetrennt), während nach Trypsin + Erepsin Pepsin nicht mehr wirkt. Bei Fibrin keine Trypsinwirkung mehr nach Pepsin-Erepsin, wohl aber Pepsin nach Trypsin-Erepsin. Bei Glutin und Edestin war die Kombination Trypsin-Erepsin die günstigste; jedoch wurde nie ein totaler Abbau erreicht.

KAMIYA **394)** fand bei Edestin in 7 Tagen Zunahme an COOH: Pepsin 14,6 %; dann Trypsin bis 66,5 %, Erepsin bis 100 %. Erepsin nach Pepsin 22 Tage 85,9 %. Casein dementsprechend 23,2 %; 73,4 %; 100 %; Erepsin nach Pepsin 23 Tage 93,8 %. Gelatine: 8,5 %; 43,3 %; 100 %. Erepsin nach Pepsin 22 Tage 103 %.

Für Eialbumin liegt eine Arbeit von McFARLANE c.s. **395)** vor, die sich noch im alten Geleise bewegt. Eialbumin wird durch Pepsin zu 100 % hydrolytisch zerlegt, wobei kein Acidalbumin (Metaprotein) als notwendiges erstes Abbauprodukt entsteht. Es bilden sich nach 12 Stunden 55 % Proteosen, 17 % Peptone, 12 % Subpeptone und 5 % Rest-N. Auch DESAI **396)** hat nur die N-Verteilung in verschiedenen durch fraktionirte Dialyse getrennten Fraktionen des peptischen Abbaus untersucht; es lassen sich dabei auch Anteile mit längeren Ketten, charakterisirt durch das freie NH_2-N, herausholen.

Dagegen haben CALVERY und WALDSCHMIDT-LEITZ **397)** an ganz reinem kristallisirtem Ovalbumin mit einheitlichen wirkungsreinen Enzymen den Stufenabbau exakt untersucht. Wie bereits erwähnt, ist hier das Aequivalenzgesetz im Gegensatz zum Glutin genau erfüllt, Prolinpeptide sind also nicht vorhanden. Mit kombinirter Enzymwirkung werden 75 % des Gesamt-N (ebenso wie bei der Säurespaltung) als Amino-N gefunden, davon 8 % präformirt. Reine Tryptase setzt ebenso wie Pepsin $^1/_3$ der Peptid-bindungen frei, Papain-HCN $^2/_3$. Pepsin nach Tryptase ist ebenso unwirksam wie Tryptase nach Pepsin, beide nach Papain-HCN. Papain-HCN nach Pepsin oder Tryptase setzt ein weiteres Drittel frei, sodaß der gleiche Endzustand wie bei Papain-HCN allein erreicht wird. Protaminase wirkt gleich stark nach Pepsin und Trypsin, nicht nach Papain-HCN, nicht auf das Protein selbst. Das Enzym setzt 6 bis 7 % des Gesamt-N in Freiheit, mehr als das gesamte Arginin ausmacht, wahrscheinlich entspricht diese Menge allen basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin, Histidin). Polypeptidasen wirken nach Tryptase, Tryptase + Protaminase und Papain-HCN zum gleichen Spaltungsgrad (Amino-N/Gesamt-N = 60 %), nach Pepsin dagegen nur zu 50 %, also $^2/_3$ der überhaupt möglichen Spaltung (s. o.). Dipeptidase führt in beiden Fällen zum Ende (75 %). Trotzdem also Pepsin und Tryptase beide $^1/_3$ freisetzen, sind die Produkte verschieden, da die tryptischen weitergehend durch die Polypeptidasen gespalten werden als die peptischen. (Ganz ähnliche Beobachtungen hatten schon FELIX und LANG **397a)** am Globin gemacht; Trypsin baut bis zu 61 % ab, und Pepsin wirkt danach nicht mehr).

Beim Ovalbumin zeigt sich, daß nach der Tryptasenwirkung die Polypeptidasen noch mehr zu tun finden, der Dipeptidase weniger übrig lassen als nach Pepsin. Hier spaltet also Pepsin „tiefer" im Gegensatz zur üblichen Annahme. Es scheint hauptsächlich Tripeptide zu bilden, die dann durch die Polypeptidase in Dipeptide und durch Dipeptidase zu Ende gespalten werden, während Tryptase noch einige höhere Gruppen freilegt. Nach neueren Angaben entstehen durch Pepsin auch Dipeptide (l.c. 378a). Folgende Tabelle enthält die Resultate ohne Papain.

---

394) ***Sh. Kamiya,*** Argininabspalt. bei dem proteol. Eiweißabbau. Jl. of Biochem., **22,** 263 (1935). S.A. — 395) ***J. McFarlane, V. E. Dunbar, H. Borsook, H. Wasteneys,*** Stages of peptide dig. of egg albumin. Jl. of gen. Phys., **10,** 437 (1927). — 396) ***Sh. V. Desai,*** Separ. of the dig. prod. proteins etc. Biochem. Jl., **24,** 1897 (1930). — 397) ***H. O. Calvery,*** Cryst. egg albumin. Hydrolysis etc. Jl. of Biol. Chem., **102,** 73 (1933). S.A.; ***H. O. Calvery, E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner,*** Frakt. enz. Abbau von Eieralbumin. Naturwiss. **1933,** 316. S.A. — 397a) ***K. Felix, A. Lang,*** Über die Wirk. v. Pepsinsalzsäure nach Trypsin-kinase. Zs. phys. Chem., **184,** 205 (1929).

Enzym	Spaltung in Proz. des Gesamtstickstoffs
Pepsin	24
Carboxypolyp. od. Aminopolyp.	24
Dipeptidase	24
Pankreasproteinase	24
Carboxypolyp. od. Aminopolyp.	36
Dipeptidase	12
Pepsin	24
Protaminase	6
Pankreasproteinase	24
Protaminase	6

Die Arbeit hat also das erstaunliche Ergebnis, daß beim Ovalbumin die beiden Hauptproteinasen genau bis zu demselben Punkt der Spaltung führen, aber auf anderen Wegen, und keine nach der anderen noch wirkt.

Eine Arbeit von LAURESCO **397b)** untersucht die Wirkung von Trypsinkinase, dann Erepsin auf Casein, Edestin, Glutin, Gliadin, Ovalbumin. Tryptase allein spaltet etwa 50% des Amino-N ab, nur bei Ovalbumin 73 % (Carboxy-polyp. nicht abgetrennt). Tryptase + Erepsin über 80 %.

Endlich ist noch auf die systematischen Untersuchungen von ABDERHALDEN **398)** zu verweisen, in denen er vergleichend Alkali, Säure und Fermente auf verschiedene Proteine und verwandte Stoffe einwirken ließ, um den stufenweisen Abbau zu studiren. Die Arbeiten dienten vorzugsweise dem Zwecke, bestimmte Strukturen auszuschließen oder wahrscheinlich zu machen, und sind uns im Einzelnen bereits z. T. §§ 476 ff. begegnet. Für das hier interessirende rein enzymtypische Verhalten der Proteine hat das ungemein reiche Material an einzelnen Daten keine wesentlich neuen Gesichtspunkte ergeben, so daß wir die Arbeiten hier nicht ausführlicher behandeln können.

Außer diesen Bestimmungen der gesamten N-Verteilung bei stufenförmigem Abbau hat man auch das Schicksal bestimmter leicht greifbarer Aminosäuren in erhaltener Peptidbindung bei der Proteinasenwirkung verfolgt. Freie Aminosäuren deuten immer auf Peptidasenwirkung, so daß die älteren Angaben hier nicht zu verwerten sind. Es liegen mehrere solcher Angaben sehr zerstreut auch in der neueren Literatur vor, es seien ohne Anspruch auf Vollständigkeit einige hier wiedergegeben. Eine sehr wichtige Rolle scheint bei allen Abbauvorgängen das **Tyrosin** insofern zu spielen, als es sowohl für Pepsin wie für Trypsin irgendwie einen bevorzugten Angriffspunkt bietet. (Es galt ja schon früher für das charakteristische Merkmal der leicht spaltbaren „Hemi"-gruppe). Nach FÜRTH **399)** wird es aus den meisten Proteinen sowohl durch Trypsin wie durch Alkali am schnellsten abgespalten. Auch in höheren Polypeptiden erleichtert es den Angriff, s. WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 204, 351; (vgl. S. 672). Ebenso scheint die Angreifbarkeit des Seidenfibroins mit dem Tyrosingehalt zusammenzuhängen (l. c. 284).

Hierzu einige neuere Angaben: Tyrosin wird aus Caseinogen durch Pepsin sehr schnell abgespalten (50 % in 24 Stunden) (TORBET und BRADLEY, l. c. 385). Die Kurve des Tyrosinabbaus verläuft gleichmäßig mit der Bildung von Bruchstücken, die nicht mehr durch Trichloressigsäure fällbar sind. Auch Insulin verliert bei der Inaktivirung durch Proteasen zuerst

397b) ***C. Lauresco,*** Act. protéol. du suc pancr. etc. Arch. internat. Phys. **42,** 169 (1935). BPh **92,** 633. — 398) ***E. Abderhalden c.s.,*** Vergl. Unt. über Einw. von Alkali, Säuren u. Ferm. auf Eiweißstoffe etc. Zs. phys. Chem., **169,** 196 (1927), **174,** 47 (1928); Fermentforsch., **10,** 12, **11,** 127, 345 (1929/30) — 399) ***O. Fürth, A. Fischer,*** Ermittl. des Tyrosingehalts von Proteinen. Bioch. Zs., **154,** 1 (1924).

Es ist auffallend, daß Erepsin direkt nach Pepsin total zu freiem Arginin aufspaltet, and die Zwischenschaltung von Trypsin die totale Freilegung verhindert. Quantitative mmung sowohl durch Arginase + Urease wie als Flavianat.

Anhang: Sonderwirkungen auf einige Proteine und proteinähnliche Stoffe.

Kohlenoxyd-hämoglobin wird in demselben Umfang wie Oxyhämoglobin durch Pepsin, tase und Erepsin abgebaut, nur in etwas anderem Zeitmaß (ABDERHALDEN **406**)). Nor-: Abbau von Oxy-hämoglobin s. FELIX und BUCHNER (l. c. 359).

Hämocyanin wird von Papain nicht zerlegt; eine Ausscheidung von Kristallen aus Schnek-.ut nach Zusatz von Papain (DHÉRÉ **407**)) erwies sich nach PHILIPPI **408**) als reines ocyanin. Papain scheint also nur Eiweißballast abzubauen, das dem Hämocyanin zugrunde-ıde Polypeptid aber nicht anzugreifen.

Denaturirte Proteine. Die lange bekannte Tatsache, daß genuine Proteine ihre Resistenz ı Trypsin (§ 478) durch Denaturirung verlieren, hat LIN **409**) am Ovalbumin erneut estellt. Der opt. ph wird gegen den Neutralpunkt verschoben. Pepsin greift genuines denaturirtes gleichmäßig an. Auch COHN **410**) fand wieder dasselbe, wie auch die Auf-ng der Resistenz durch kurze Pepsinwirkung.

Racemisirtes Ovalbumin und Casein werden entgegen DAKIN und DUDLEY leicht griffen (LIN **411**)).

Chemisch veränderte Proteine. Methylencasein wird nach MASUI (l. c. 208) ebensogut durch n und Trypsin gespalten wie Casein selbst; ebenso sulfonirtes und äthoxylirtes Edestin 399a). Über die Spaltung von Benzyliden-clupein s. § 477, (l. c. 238). Benzoylirung Edestin und Glutin setzt die Angriffsfähigkeit gegen Tryptase herab (KAWAI **412**)), resp. sie auf (KIESEL, l. c. 399a). Naphtalinsulfocasein wird nach MATSUMOTO **413**) von n garnicht, von Trypsin langsam angegriffen, die entstehenden Abbauprodukte werden Erepsin weiter gespalten. β-Naphtalinsulfogelatine, -gelatopepton, und -casein werden YOSHIMATSU **413a**) von Pankreastrypsin und Nierenferment wenig, von beiden nachein- dagegen sehr stark gespalten. Benzolsulfogelatine wird durch Pepsin und Schweinenieren-ct sehr wenig, durch Trypsin und Schweinedarm-extract merklich gespalten. — Desamino-eine werden nach NAKASHIMA **413b**) beinahe eben so gut durch Pepsin und Tryptase abgebaut, ie normalen Proteine (Casein, Edestin); man muß nur bei dem dann opt. ph arbeiten, der etwas hoben ist, meist nach der sauren Seite; für Edestin von KIESEL (l. c. 399a) bestätigt. — Jodirte tine wird nach MASUI **414**) von Trypsin ebenso gespalten wie unveränderte, von verschiedenen epsinen jedoch schwächer oder stärker. — Jodtropon liefert nach BARKAN **414a**) bei trypti- Verdauung neben organisch gebundenem Jod auch etwas J'. Diese J'-Bildung geht vielleicht das Dijodtyrosin, da aus diesem durch Alkali in Gegenwart von Trypsin J' beschleunigt abge-en wird (**414b**). — Angaben über den Angriff von nitrirtem und mit verschiedenen Aldehyden handeltem Kollagen und Fibrin durch Pepsin, Trypsin und „Kollagenase" s. SSADIKOW (l. c. 46). stitution der freien NH_2-Gruppen mit d- und l-Leucin (im Blutalbumin) führt zu einer glichen Resistenzerhöhung gegen Pepsin wie Tryptase, besonders beim d-Leucyl-albumin (**415**).

406) ***E. Abderhalden, M. Damodaran,*** Abbau von Oxy- und CO-Hämoglobin etc. entforsch., **11,** 345 (1930). S.A. — 407) ***Ch. Dhéré, Chr. Baumeler,*** Act. de la papaine 'hémocyanine. Soc. Biol., **101,** 1071 (1929). — 408) ***E. Philippi, F. Heruler,*** Einw. Papain auf Hämocyanin. Zs. phys. Chem., **191,** 28 (1930). — 409) ***K.-H. Lin c.s.,*** Eff. of ;ur. on dig. of ovalbumin etc. Proc. Soc. exp. Biol., **25,** 199 (1927); Chin. Jl. of Physiol., **2,** 1928); BPh **44,** 822, **45,** 599. — 410) ***E. W. Cohn, A. White,*** Enz. hydrol. of raw etc. egg ı. Jl. of Biol. Chem., **109,** 169 (1935). — 411) ***K.-H. Lin c.s.,*** Eff. of racem. on dig. of ı etc. Proc. Soc. exp. Biol., **25,** 201; Chin. Jl. of Physiol., **2,** 131 (1928); BPh **44,** 823, **45,** — 412) ***T. Kawai,*** Wirk. der proteol. F. auf die Benzoylproteine. Acta Schol. Med. Kyoto, 67 (1928); BPh **50,** 344. — 413) ***A. Matsumoto,*** Wirk. der proteol. F. auf die sulfon. ißst. Acta Schol. Med. Kyoto, **10,** 219 (1928); BPh **46,** 581. — 413a) ***Guushi Yoshi-ru,*** Über die Wirk. d. proteolyt. Ferm. auf β-Naphthalinsulfogelatine u. a. Acta Schol. Med. o, **12,** 131, 141, 147 (1929); BPh **53,** 407. — 413b) ***R. Nakashima,*** Verdaul. der Desamino-ine etc. Jl. of Biochem., **5,** 293 (1925). S.A. — 414) ***H. Masui,*** Verh. der Jodgelatine gegen olyt. Ferm. Acta Schol. Med. Kyoto, **13,** 331 (1931); BPh **63,** 175. — 414a) ***G. Barkan, ingisepp,*** Trypt. Jodeiweißverdau. Arch. exp. Path. Pharmakol., **10,** 610 (1931). — 414b) ***rrkan, G. Kingisepp,*** Über die vermeintl. Jodidabspalt. aus Dijodtyrosin bei trypt. Verdau. hys. Chem., **204,** 219 (1932). — 415) ***E. Abderhalden, E. Koelitz,*** Abbau von l-, d-, und Plasmaalb. etc. Ferm. F. **14,** 483 (1935). S.A.

sein Tyrosin (FISCHER, l. c. 423). Nach KIESEL **399a)** wird die Spaltbarkeit von Edestin durch Besetzung der freien OH-Gruppen (Benzoylirung) aufgehoben, nach Abspaltung des Benzoyls wieder hergestellt.

Tryptophan wird durch Pepsin garnicht, bei der Pankreatinspaltung schnell frei (KRAUS RAGINS, l. c. 205) (vgl. § 467), Casein in 1 Stunde 75 %, Edestin 50 %.

Cystin wird bei der peptischen Verdauung von Caseinogen langsamer frei. Nach langer Wirkung verbleibt noch ein unlöslicher Rückstand mit 0,4 % Cystin bei 1 % Tyrosin (TORBET, l. c. 385). Nach JONES, l. c. 327, **400)** wird freies Cystin nicht gebildet, das gesamte Cystin geht in eine lösliche P-arme Fraction des Caseins (§ 477a).

Prolin wird dagegen aus Casein schwer abgespalten, es ist in der „Antigruppe" vertreten (s. § 478 und HUNTER **401)**); es liegt dies mit daran, daß Prolinpeptide ja überhaupt gegen die Peptidasen des Pankreas resistent sind (BERGMANN, l. c. 368).

Besonders häufig ist das sehr charakteristische und leicht nachweisbare Arginin zu solchen Versuchen benutzt worden. In dieser Hinsicht scheinen sich Pepsin und Trypsin ganz verschieden zu verhalten. Die Abspaltung von 20 % des Gesamtarginins aus Clupein durch Protaminase (l.c. 388), von 50 % durch Trypsin-kinase (l. c. 390) ist bereits erwähnt; hier nur noch einige Angaben für andere Proteine. Sie sind recht verschiedenartig, weil eine sichere Methodik des Nachweises noch nicht besteht. Verwendung von Arginase ist bedenklich, da es schwer ist, absolut proteasefreie Arginase darzustellen, und die Ausfällung durch Flaviansäure kann in den komplicirten Gemischen unvollkommen sein.

DAUPHINEE und HUNTER **402)** fanden, daß Tryptase aus Fibrin schnell $^2/_3$ des Arginin freisetzt, aus anderen Proteinen bis zu $^4/_5$. Der zeitliche Verlauf ist verschieden (s.a. § 465).

LIEBEN **403)** fand andere Zahlen: Casein ca. 57 %, Glutin bis zu 79 %. Papain-HCN bei Casein, Glutin, Serumalbumin 72 % bis 74 %. Nach TORBET u. BRADLEY (l. c. 385), **(404)** erreicht die Freilegung durch Tryptase bei Casein und Glutin in 15 Tagen 80 %, gleichgültig ob Tryptase direkt oder nach Pepsin wirkt. Pepsin allein spaltet Arginin sowohl aus Caseinogen wie aus Glutin sehr langsam ab (in 15 Tagen 20 % bei Casein, 5 % bei Glutin). Pepsin öffnet also keine Argininbindung, die nicht auch der Tryptase direkt zugänglich wäre. LIEBEN fand für Pepsin allein fast die gleichen Werte wie bei Trypsin. KAMIYA **405)** fand dagegen durch Pepsin überhaupt keine Abspaltung von durch Arginase spaltbarem Arginin (Edestin, Casein, Glutin) und führt die abweichenden Ergebnisse auf Proteasengehalt der verwendeten Arginase zurück. Pepsin 7—8 Tage, Trypsin (incl. Carboxypolypeptidase) 7—12 Tage, Erepsin 22 Tage:

Enzym	Edestin	Casein	Glutin
Pepsin	0	0	0,7
Trypsin	30	26,9	43,5
Erepsin	63,4	67,7	80,4
Pepsin	0	0	
Erepsin	79	100,0	91,6

399a) ***A. Kiesel, O. Roganowa,*** Über die Einw. des Trypsinfermentkomplexes auf substit. Eiweiß. Zs. phys. Chem., **238,** 149 (1936). — 400) ***D. B. Jones, Ch. E.F. Gersdorff,*** Rate of liber. of cystine on hydrol. of caseine. Jl. of Biol. Chem., **101,** 657 (1933). — 401) ***A. Hunter,*** Progress of trypt. dig. of prot. etc. Trans. Roy. Soc. Canada (III) **16,** V. S. 71 (1922). — 402) ***I. A. Dauphinee, A. Hunter,*** Rate of liber. of arginine in trypt. dig. Biochem. Jl., **24,** 1128 (1930). — 403) ***F. Lieben, H. Lieber,*** Abspalt. von Arginin aus dem Eiweißverband durch Ferm. Bioch. Zs., **275,** 38 (1935). — 404) ***V. Torbet, H. C. Bradley,*** Unmask. of arginine in peptic dig. Jl. of Biol. Chem., **97,** CX (1932). — 405) ***Sh. Kamiya,*** Argininabspalt. bei dem proteol. Eiweißabbau. Jl. of Biochem., **22,** 263 (1935). S.A.

Es ist auffallend, daß Erepsin direkt nach Pepsin total zu freiem Arginin aufspaltet, während die Zwischenschaltung von Trypsin die totale Freilegung verhindert. Quantitative Bestimmung sowohl durch Arginase + Urease wie als Flavianat.

Anhang: Sonderwirkungen auf einige Proteine und proteinähnliche Stoffe.

Kohlenoxyd-hämoglobin wird in demselben Umfang wie Oxyhämoglobin durch Pepsin, Tryptase und Erepsin abgebaut, nur in etwas anderem Zeitmaß (ABDERHALDEN 406)). Normaler Abbau von Oxy-hämoglobin s. FELIX und BUCHNER (l. c. 359).

Hämocyanin wird von Papain nicht zerlegt; eine Ausscheidung von Kristallen aus Schnekkenblut nach Zusatz von Papain (DHÉRÉ 407)) erwies sich nach PHILIPPI 408) als reines Hämocyanin. Papain scheint also nur Eiweißballast abzubauen, das dem Hämocyanin zugrundeliegende Polypeptid aber nicht anzugreifen.

Denaturirte Proteine. Die lange bekannte Tatsache, daß genuine Proteine ihre Resistenz gegen Trypsin (§ 478) durch Denaturirung verlieren, hat LIN 409) am Ovalbumin erneut festgestellt. Der opt. ph wird gegen den Neutralpunkt verschoben. Pepsin greift genuines und denaturirtes gleichmäßig an. Auch COHN 410) fand wieder dasselbe, wie auch die Aufhebung der Resistenz durch kurze Pepsinwirkung.

Racemisirtes Ovalbumin und Casein werden entgegen DAKIN und DUDLEY leicht angegriffen (LIN 411)).

Chemisch veränderte Proteine. Methylencasein wird nach MASUI (l. c. 208) ebensogut durch Pepsin und Trypsin gespalten wie Casein selbst; ebenso sulfonirtes und äthoxylirtes Edestin (l. c. 399a). Über die Spaltung von Benzyliden-clupein s. § 477, (l. c. 238). Benzoylirung von Edestin und Glutin setzt die Angriffsfähigkeit gegen Tryptase herab (KAWAI 412)), resp. hebt sie auf (KIESEL, l. c. 399a). Naphtalinsulfocasein wird nach MATSUMOTO 413) von Pepsin garnicht, von Trypsin langsam angegriffen, die entstehenden Abbauprodukte werden von Erepsin weiter gespalten. β-Naphtalinsulfogelatine, -gelatopepton, und -casein werden nach YOSHIMATSU 413a) von Pankreastrypsin und Nierenferment wenig, von beiden nacheinander dagegen sehr stark gespalten. Benzolsulfogelatine wird durch Pepsin und Schweinenierenextract sehr wenig, durch Trypsin und Schweinedarm-extract merklich gespalten. — Desaminoproteine werden nach NAKASHIMA 413b) beinahe eben so gut durch Pepsin und Tryptase abgebaut, wie die normalen Proteine (Casein, Edestin); man muß nur bei dem dann opt. ph arbeiten, der etwas verschoben ist, meist nach der sauren Seite; für Edestin von KIESEL (l. c. 399a) bestätigt. — Jodirte Gelatine wird nach MASUI 414) von Trypsin ebenso gespalten wie unveränderte, von verschiedenen Kathepsinen jedoch schwächer oder stärker. — Jodtropon liefert nach BARKAN 414a) bei tryptischer Verdauung neben organisch gebundenem Jod auch etwas J′. Diese J′-Bildung geht vielleicht über das Dijodtyrosin, da aus diesem durch Alkali in Gegenwart von Trypsin J′ beschleunigt abgespalten wird (414b). — Angaben über den Angriff von nitrirtem und mit verschiedenen Aldehyden vorbehandeltem Kollagen und Fibrin durch Pepsin, Trypsin und „Kollagenase" s. SSADIKOW (l. c. 46). Substitution der freien NH_2-Gruppen mit d- und l-Leucin (im Blutalbumin) führt zu einer anfänglichen Resistenzerhöhung gegen Pepsin wie Tryptase, besonders beim d-Leucyl-albumin (415).

406) ***E. Abderhalden, M. Damodaran,*** Abbau von Oxy- und CO-Hämoglobin etc. Fermentforsch., **11**, 345 (1930). S.A. — 407) ***Ch. Dhéré, Chr. Baumeler,*** Act. de la papaine sur l'hémocyanine. Soc. Biol., **101**, 1071 (1929). — 408) ***E. Philippi, F. Heruler,*** Einw. von Papain auf Hämocyanin. Zs. phys. Chem., **191**, 28 (1930). — 409) ***K.-H. Lin c.s.,*** Eff. of denatur. on dig. of ovalbumin etc. Proc. Soc. exp. Biol., **25**, 199 (1927); Chin. Jl. of Physiol., **2**, 107 (1928); BPh **44**, 822, **45**, 599. — 410) ***E. W. Cohn, A. White,*** Enz. hydrol. of raw etc. egg white. Jl. of Biol. Chem., **109**, 169 (1935). — 411) ***K.-H. Lin c.s.,*** Eff. of racem. on dig. of casein etc. Proc. Soc. exp. Biol., **25**, 201; Chin. Jl. of Physiol., **2**, 131 (1928); BPh **44**, 823, **45**, 600. — 412) ***T. Kawai,*** Wirk. der proteol. F. auf die Benzoylproteine. Acta Schol. Med. Kyoto, **11**, 267 (1928); BPh **50**, 344. — 413) ***A. Matsumoto,*** Wirk. der proteol. F. auf die sulfon. Eiweißst. Acta Schol. Med. Kyoto, **10**, 219 (1928); BPh **46**, 581. — 413a) ***Guushi Yoshimatsu,*** Über die Wirk. d. proteolyt. Ferm. auf β-Naphthalinsulfogelatine u. a. Acta Schol. Med. Kyoto, **12**, 131, 141, 147 (1929); BPh **53**, 407. — 413b) ***R. Nakashima,*** Verdaul. der Desaminoproteine etc. Jl. of Biochem., **5**, 293 (1925). S.A. — 414) ***H. Masui,*** Verh. der Jodgelatine gegen proteolyt. Ferm. Acta Schol. Med. Kyoto, **13**, 331 (1931); BPh **63**, 175. — 414a) ***G. Barkan, G. Kingisepp,*** Trypt. Jodeiweißverdau. Arch. exp. Path. Pharmakol., **10**, 610 (1931). — 414b) ***G. Barkan, G. Kingisepp,*** Über die vermeintl. Jodidabspalt. aus Dijodtyrosin bei trypt. Verdau. Zs. phys. Chem., **204**, 219 (1932). — 415) ***E. Abderhalden, E. Koelitz,*** Abbau von l-, d-, und d, l- Plasmaalb. etc. Ferm. F. **14**, 483 (1935). S.A.

Bindung von Metallen an Ovalbumin wirkt auf die Pepsinverdauung je nach dem Metall und der Konzentration hemmend oder fördernd. Bei Sättigung mit Fe scheint es unangreifbar zu werden (**415a**).

Proteinähnliche biologische Stoffe. Spaltung von Glutathion s. § 469. **Insulin** wird durch Proteinasen zerstört, s. H.W. S. 1673. Bestätigung an reinem Insulin z. B. FELIX **416**) CORNELI **417**). Resistent gegen alle Peptidasen, also auch „Trypsin", d. h. Carboxypolypeptidase (**416**); Tryptase, Papain, Kathepsin (aktivirt) (SCHMIDT **418**)) heben die Wirkung völlig auf, unter Auftreten freier NH_2-Gruppen; ebenso wirkt Blut, also wohl die Proteinase (KARELITZ **419**)). DIRSCHERL **420**) hat gezeigt, daß die Zerstörung eine echte Hydrolyse ist; jedoch geht die Zerstörung stets schneller als die Hydrolyse (CHARLES und SCOTT **421**), FREUDENBERG **422**)). Nach FISHER und SCOTT **423**) wird dabei zuerst Tyrosin abgespalten, was für den Verlust der Wirksamkeit wesentlich ist. Nach völliger Aufhebung der Wirksamkeit geht die Proteolyse als solche weiter (FREUDENBERG). Auch Acetyl-insulin wird durch Pepsin und Trypsin zerstört (FREUDENBERG). Das dem Insulin verwandte, aber weniger hochmolekulare **Oxytocin**, das Hormon des Hypophyse-Hinterlappens, wird durch Papain kaum angegriffen (FREUDENBERG **424**)), wohl aber durch Trypsin (THORPE **425**)), sowie durch Peptidasen, und zwar Dip. schneller als Aminopolyp. (**425a**)). — Das aus dem Schwangeren-harn gewonnene Hypophyse-Vorderlappenhormon wird nach REISS c.s. **424a**) nur durch „aktivirtes Trypsin" angegriffen, Pepsin, inaktives Trypsin, Carboxy-polypeptidase und Amino-polypeptidase wirken nicht, im Gegensatz zur älteren Angabe von REISS und HAUROWITZ **424b**). — Auch Hirudin wird nach WALDSCHMIDT-LEITZ **426**) gespalten. — Über die Zerstörung der Enzyme durch Proteasen wird jeweils bei den einzelnen Enzymen berichtet.

Tuberkulin enthält ein wasserlösliches Protein, das von Pepsin und Trypsin zerlegt wird, nicht von Erepsin (SEIBERT **427**)). Virus von ROUS und FUJINAMI ist resistent gegen Trypsin und Carboxy-polypeptidase; es wird durch ein unbekanntes Ferment des Pankreas zerstört (PIRIE **427a**)). Über den Einfluß auf Lapinevirus s. SANDER **428a**).

Ricin wird von Pepsin und Trypsin, nicht Erepsin entgiftet (**428**); Antiricin ist gegen Proteasen resistent (REUTER **429**)), und zwar gegen Tryptase + Carboxypolypeptidase und Erepsin; Pepsin nicht geprüft.

Zerstörung von Praecipitinen und Antigenen durch Pepsin und Trypsin s. HAKU **429a**).

415a) ***P. Mascherpa,*** Dig. in vitro d. metallo-proteine. Boll. Soc. Ital. Biol., **5**, 142, 148 (1930); BPh **58**, 165, **59**, 325. — 416) ***K. Felix, E. Waldschmidt-Leitz,*** Zur chem. Natur des Insulins. Ber. Chem. Ges., **59**, 2367 (1926). — 417) ***W. Corneli,*** Einw. proteol. F. auf das Insulin. Zs. phys. Chem., **199**, 217 (1931). — 418) ***A. A. Schmidt,*** Über Inaktivirung des Insulins. Klin. Ws., **9**, 1021 (1930); Zs. exp. Med., **70**, 27 (1930). — 419) ***S. Karelitz, P. Cohen, S. D. Leader,*** Insulin inactiv. by human blood etc. Arch. of int. Med. **45**, 546, 690 (1930). — 420) ***W. Dirscherl,*** Die Wirkung von Pepsin auf Insulin etc. Zs. phys. Chem., **180**, 217 (1929). — 421) ***N. F. Charles, D. A. Scott,*** Action of proteol. enz. on crystalline insulin. Trans. Roy. Soc. Canada (III), **24**, V. 95 (1930). — 422) ***K. Freudenberg c.s.,*** Einw. proteol. Ferm. auf Insulin. Zs. phys. Chem., **202**, 159, **213**, 248 (1931/2). — 423) ***A. M. Fisher, D. A. Scott,*** Pept. hydrol. of insulin. Jl. of Biol. Chem., **106**, 289 (1933). — 424) ***K. Freudenberg, E. Weiss, H. Biller,*** Oxytocin. Zs. phys. Chem., **233**, 172 (1935). — 424a) ***M. Reiss c.s.,*** Über die Inaktiv. des aus Schwangeren-harn gew. Hypophyse-Vorderlappenhormons d. proteolyt. Enz. Endokrinol., **8**, 22 (1931); BPh **63**, 513. — 424b) ***M. Reiss, F. Haurowitz,*** Über die Inaktiv. etc. Zs. exp. Med., **68**, 371 (1929); BPh **58**, 584. — 425) ***M. V. Thorpe,*** Experim. on the chem. nature of the oxytocic principle of the pituitary gland. Biochem. Jl., **20**, 374 (1926); BPh **37**, 160. — 425a) ***J. M. Gulland, T. F. Macrae,*** Action of proteol. enz. on the oxytocic principle of the pituitary gland. Nature, **131**, 470 (1933). — 426) ***E. Waldschmidt-Leitz, P. Stadler, F. Steigerwaldt,*** Über Blutgerinnung. Zs. phys. Chem., **183**, 39 (1929). — 427) ***F. B. Seibert, E. R. Long,*** Eff. of proteol. enz. upon the active princ. of tuberculin. Jl. of Pharm., **27**, 256 (1926); BPh **38**, 311. — 427a) ***A. Pirie,*** The eff. of enz. on the pathogen. of the Rous a. Fujinami tum. viruses. Biochem. Jl., **27**, 1894 (1933). — 428) ***G. Gaetani, R. Pistorio,*** Diger. d. ricina da parte di ferm. proteol. Arch. di Fis., **27**, 1 (1929); BPh **52**, 484. — 428a) ***F. Sander,*** Über den Einfl. eiweißspalt. Ferm. auf das Lapinevirus. Zs. Immunforsch., **83**, 220 (1934); BPh **84**, 484. — 429) ***F. Reuter,*** Antiricin. Bioch. Zs., **231**, 175 (221) (1931). — 429a) ***H. Haku,*** Über die Einw. der trypt. u. pept. Verdau. auf die Praecipitinogene. Okayama Igakkai Zasshi, **42**, 1584 (1930); BPh **58**, 599.

Cerebron, das eine Amid-bindung von Cerebronsäure mit Sphingosin $C_{18}H_{35}(OH)_2NH_2$ enthält, wird nach ABDERHALDEN 430) von Trypsin (frei von Erepsin) zu 90 % zerlegt. Spaltprodukte nicht isolirt. Da Cerebron weder ein freies NH_2 noch ein COOH enthält, ist diese Tatsache interessant; welches Enzym des „Trypsins" die Spaltung vollzieht, ist noch nicht klar, vielleicht eine Acylase.

2) Polypeptide als Modelle. Theorien des Angriffs der Proteasen.

a) Affinitäten und Angriffspunkte der Proteasen.

§ 479. Die Möglichkeit, die Spaltung der experimentell dargestellten Polypeptide als Modelle für die enzymatischen Vorgänge am Proteinmolekül zu verwerten, beruht auf zwei Voraussetzungen, die beide in der Hauptsache sichergestellt sind, während ihre Grenzen, wie es ja bei biochemischen Prozessen aller Art die Regel ist, verschwommen werden und keine festen Definitionen und Regeln mehr zulassen. Die eine Voraussetzung ist die ja eingehend behandelte, daß eben die Polypeptide in der Hauptsache, wenn auch eben nicht mit voller Genauigkeit, die Struktur der Proteine widerspiegeln.

Die zweite ist die, daß sich aus ihrem enzymtypischen Verhalten eben wegen der allgemeinen Gleichheit der Struktur gewisse Regelmäßigkeiten ableiten lassen, die zu Rückschlüssen auf den Abbau der Proteine berechtigen, wobei es ebenso wichtig ist, Gleichheiten — oder Ähnlichkeiten — aufzufinden, wie sichere Abweichungen. Die Gleichheiten können das Allgemeinbild formen, die Ungleichheiten Rückschlüsse darauf gestatten, welche anderen Modi des enzymatischen Angriffs bei Proteinen als bei Polypeptiden gegeben oder wahrscheinlich sind.

Die Gleichheit liegt darin, daß praktisch gesprochen alle Polypeptide aus „natürlichen", also der Linksreihe angehörigen Aminosäuren durch irgend eine Protease gespalten werden. Die wenigen Fälle, in denen synthetische Polypeptide dieser Art angeblich fermentresistent sind, sind enzymtypisch an sich ohne Belang; sie sind nur deswegen von Interesse, weil sie es wahrscheinlich machen, daß gerade solche Peptide nicht natürlich vorkommen.

Ebensowenig sind die wenigen beobachteten Fälle einer Spaltbarkeit optisch nicht reiner Polypeptide hier von direktem Interesse, da ja solche sicherlich im genuinen Protein nicht vorkommen. Bedeutung hat diese Erscheinung nur für die Theorie des Angriffs der Polypeptide an sich, also indirekt auch für den Eiweißabbau, weil solche unnatürlichen Polypeptide meist nur dann partiell gespalten werden, wenn die betr. Gruppe weiter vom Angriffspunkt entfernt ist. Nur als ein Beispiel sei erwähnt, daß nach WALDSCHMIDT-LEITZ 431) d, l-Leucyl-glycyl-tyrosin durch Carboxy-polypeptidase unter Tyrosinabspaltung symmetrisch zerlegt wird, durch Amino-polypeptidase dagegen nur die l-Komponente.

Wichtiger ist schon die Erscheinung, daß der Angriff der Peptidasen sich nicht auf solche Stoffe beschränkt, die man als Polypeptide im strengsten Sinne bezeichnen kann. Wir finden die verschiedenartigsten Übergänge in das Bereich der Amidasen und Acylasen; wir haben ja bereits §§ 443, 444 betont, daß hier scharfe Grenzziehungen vorderhand völlig unmöglich sind. Was aber hier wichtig ist, ist der Umstand, daß sich diese zweifelhaften Enzymtypen gerade in den Anteilen der Peptidasen vorfinden, die den Proteinasen innig gesellt sind. Um nur ein Beispiel zu geben: Chloracetyl-tyrosin, doch wahrlich kein echtes Polypeptid, dient als bevorzugtes Reagens für die typische Carboxypolypeptidase, obwohl es wohl eher von einer besonderen „Acylase" gespalten wird, die ihr anhaftet; und zudem sind wir durchaus nicht sicher, daß das, war wir nunmehr als „reine Tryptase" bezeichnen, nicht auch noch mehrere unbekannte Enzyme abweichender Specifität enthält. Für Papain gilt Ähnliches;

430) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Verh. von Cerebron geg. Ferm. Fermentforsch., **14**, 54 (1933). S.A. — 431) ***E. Waldschmidt-Leitz, H. Schlatter***, Zur stereoch. Spec. proteol. Ferm. Naturwiss., **16**, 1026 (1928). S.A.

Abgeschlossen: 26. 6. 36. Ber. Phys. 93, H. 1/2.

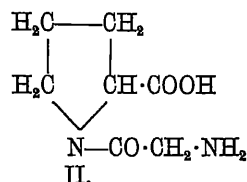
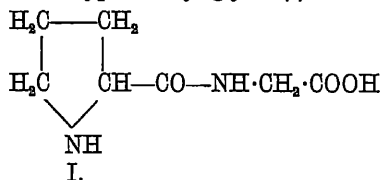
in ihm hat BERGMANN eine neue „Polypeptidase" gefunden, die ganz erheblich zu den Amidasen überleitet; wir haben sie S. 594 erwähnt und kommen unten darauf zurück. Diese noch völlig offenen Enzymprobleme sind insofern wichtig für den Proteinabbau, als es eben durchaus möglich ist, daß außer den bekannten und halbwegs definirten Enzymen noch weitere bisher nicht abgetrennte Sonderenzyme mitwirken, deren Special-affinitäten bei genauerer Erkenntnis erhebliche Verschiebungen unserer bisher tastenden Annahmen über Struktur und Abbau der Proteine herbeiführen könnten.

Von allen diesen sich ins Ungewisse verlierenden Nebenreaktionen und Möglichkeiten wollen wir nun zunächst absehen. Wir wollen nur die normale Peptidasewirkung auf normale Polypeptide hier zu Grunde legen. Dann haben wir für alle Peptidasen folgende Grundregel: Das zur Spaltung eines Polypeptids berufene Enzym wirkt stets derart, daß es durch eine besondere Affinität an eine der beiden **Endgruppen des Polypeptids** gebunden wird. Dadurch wird eine Lockerung der Bindung an der der Haftstelle benachbarten Peptidbindung —CO—NH— herbeigeführt; und an dieser Stelle zerfällt das Polypeptid. Die wenigen bisher bekannten Ausnahmen von dieser Regel, die theoretisch eben gerade für den Proteinabbau sehr wichtig sind, werden uns später beschäftigen.

Diese Endgruppen müssen natürlich normal gelagert sein; sonst sind ja die Stoffe keine normalen Peptide, d. h. sie müssen stets direkt neben der Peptidbindung in α-Stellung stehen, also an den beiden der Peptidbindung unmittelbar benachbarten C-Atomen, im einfachsten Fall also $H_2N \cdot CH_2 \cdot CO—NH \cdot CH_2 \cdot COOH$. Steht eine Endgruppe anders, so ist dies abnorme Polypeptid unspaltbar; als Beispiel sei das β-Asparagyl-tyrosin genannt (BERGMANN, l. c. 201).

Endgruppen gibt es an allen Polypeptiden zwei: eine basische, meist repräsentirt durch eine freie Aminogruppe (Ausnahme: die Prolyl-peptide); und eine saure, repräsentirt bei allen echten Polypeptiden durch ein freies Carboxyl. Nach diesen beiden polaren Endgruppen richtet sich nun die jeweilige Affinität und damit die Specifität. Wir unterscheiden also zunächst zwei Hauptgruppen der Peptidasen; die eine setzt an der basischen Gruppe an und umfaßt bisher drei Untergruppen, von denen zwei an normalen NH_2-Gruppen ansetzen und durch ihre Specifität auf die Kettenlänge verschieden sind, nämlich die Dipeptidasen und die Amino-polypeptidasen.

Eine dritte Gruppe setzt an Polypeptiden an, die anstelle eines freien NH_2 an dem einen Ende ein NH tragen; bei den natürlichen repräsentirt nur durch die Prolin enthaltenden Polypeptide. Zweifellos hier den normalen Dipeptidasen entsprechend ist die Prolyl-peptidase GRASSMANN's **432)**, die solche Polypeptide spaltet, bei denen das Prolin das Carboxyl beisteuert, also Typus Prolyl-glycin (I); denn hier muß sich ja die Affinität auf die NH-Gruppe

```
H2C——CH2                              H2C——CH2
 |    |                                 |    |
H2C   CH—CO—NH·CH2·COOH                H2C   CH·COOH
  \  /                                   \  /
   NH                                     N—CO·CH2·NH2
   I.                                     II.
```

richten. Aber auch der andere Typus, die auf Prolin-peptide (II) wirkende ebenfalls specifische Peptidase (BERGMANN **433)**) ist wahrscheinlich dem Typus nach eine umgewandelte Dipeptidase. Dann hat sie aber keine Affinität zur Iminogruppe, sondern zur Aminogruppe am Glycin, und die mangelnde Wirkung der normalen Dipeptidase, resp. die Notwen-

432) ***W. Graßmann c.s.***, Enzym. Spaltbark. der Prolin-peptide. Ber. Chem. Ges., **62**, 1307 (1929); Zs. phys. Chem., **210**, 1, **214**, 104 (1932/3). — 433) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich, F. Leinert***, Verh. von Prolin-peptiden. Zs. phys. Chem., **212**, 72 (1932). S.A.

digkeit eines eigenen Fermentes Prolin-peptidase ist durch das Fehlen des Peptid-wasserstoffes bedingt (s. u.). (Daß BERGMANN dazu neigt, diese Prolin-peptidase mit der Amino-polypeptidase gleichzusetzen, kann an dieser Stelle nicht behandelt werden, s. § 480). Die Prolyl-peptidase ist also auf Iminogruppen eingestellt und könnte als eine allgemeinere „**Imino-polypeptidase**" aufgefaßt werden (GRASSMANN, l. c. 2, S. 480), wenn die Nichtspaltbarkeit anderer Iminopeptide durch reine normale Dipeptidase gesichert wäre, z. B. von am N methylirten, so vom Sarcosin (Methylglycin). Das ist aber eben noch nicht klar, es liegen differente Angaben vor (Weiteres bei Peptidasen). Nach LEVENE (l. c. 444) soll Sarcosylglycin durch Erepsin spaltbar sein; dagegen gibt z. B. ABDERHALDEN **434)** an, daß fast alle alkylirten Peptide durch reines Darmerepsin nicht angegriffen werden. Andererseits wird Sarcosyl-tyrosin besonders exakt von Carboxy-polypeptidase, nicht von Amino-polypeptidase angegriffen (**435**); jedoch handelt es sich um katheptische Carboxy-polypeptidase aus Leber; bei dieser liegen überhaupt abweichende Specifitäten vor. Im übrigen wäre es durchaus möglich, daß Sarcosyl-peptide vom Carboxyl her von normalen, vom Imino-ende her nur von speciellen Peptidasen gespalten werden. Es liegt hier nämlich ein interessanter Zusammenhang vor: nach BERGMANN **440)** wirkt Carboxy-polypeptidase deswegen nicht auf Dipeptide, weil die benachbarte Aminogruppe die Wirkung aufhebt. In den Sarcosyl-peptiden ist aber eben diese hemmende Aminogruppe abgedeckt *). Auch einige andere Dipeptide, in denen nahe an der Aminogruppe saure Gruppen stehen, werden durch Carboxy-pol. gespalten, so Tyrosyl-tyrosin. Näheres s. u.

Die zweite Hauptgruppe richtet ihre Affinität in der Hauptsache auf das Carboxyl des anderen Kettenendes. Es sind die Carboxy-polypeptidasen, die bisher schon ziemlich mannigfaltig sind, und deren es wohl noch mehr gibt.

Sie gliedern sich einerseits nach ihrer äußerlichen Zugehörigkeit (ph, Aktivirung etc.) zu den Proteinasen in die tryptischen und katheptischen Carboxy-polypeptidasen, andererseits nach Affinitäten zu bestimmten Strukturen; es gibt neben der hierhergehörigen Protaminase, einer Arginin-carboxy-polypeptidase (die aber vielleicht auf alle Carbonsäuren mit mehr als einer basischen Gruppe eingestellt ist, s. CALVERY, l. c. 397), wahrscheinlich noch besondere Leucin- und Tyrosin-carboxy-polypeptidasen (ABDERHALDEN **436**)).

Alle solche Einzelheiten, ebenso wie die experimentellen Belege für diese Affinitäten und die mehr oder weniger sicheren Ausnahmen werden uns erst bei den Peptidasen beschäftigen. Das Hauptargument ist eben das, daß die erste Gruppe versagt, wenn man die freie Aminogruppe substituirt, die andere, wenn man das Carboxyl verändert, etwa verestert oder amidirt.

Sehr wichtig ist, daß die Affinität der Peptidasen nicht nur auf die Existenz dieser Endgruppen gerichtet ist, sondern zum wirksamen Angriff noch weitere Bedingungen erfüllt sein müssen. Die eine, die insbesondere von BERGMANN **437)—442)** in den Vorder-

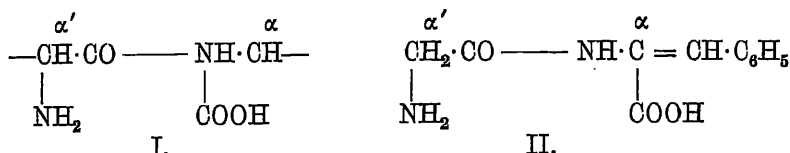
*) ABDERHALDEN hat tatsächlich (Fermentforsch. **18**, 396) auch Spaltung von Sarcosyl-peptiden durch „Trypsin" gefunden.

434) ***E. Abderhalden c.s.***, Stud. üb. Einfl. v. n-Alkali, Erepsin u. Trypsin-Kinase auf d-l-Serin etc. enthaltende Polypept. etc. Fermentforsch., **11**, 287, 350, 382, 399, 515, 529, 539, **18**, 396 (1930/32). S.A. — 435) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Aus der Leber darstellb. Ferm. aus der Gruppe der Proteinasen etc. Fermentforsch., **18**, 545 (1933). S.A. — 436) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Zur Einheitlichkeit des Trypsinkomplexes. Fermentforsch., **10**, 478 (1929), **12**, 432, 559 (1931). S.A. — 437) ***M. Bergmann***, Aufgaben der Synth. für die Erf. der Eiweißstoffe. Klin. Ws. **1932**, 1569. S.A. — 438) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich***, Bind.-Art des Prolins in der Gelatine. Ber. Chem. Ges., **65**, 1747 (1932). S.A. — 439) ***M. Bergmann, L. Zervas***, Wirk. und Spec. der Dipeptidase. Zs. phys. Chem., **224**, 11 (1934). S.A. — 440) ***M. Bergmann***, Rec. res. in the field of proteins and prot. enz. Jl. Am. Leather Assoc. **29**, 353 (1934). S.A. — 441) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich***, Spez. . . . der Carboxy-polypeptidase. Zs. phys. Chem., **224**, 45 (1934). S.A. — 442) ***M. Bergmann, L. Zervas c.s.***, Spec. of dipeptidase. Jl. of Biol. Chem., **109**, 325 (1935).

grund gerückt, und indirekt auch für die Struktur des angriffsfähigen Proteinmoleküls wichtig ist, ist das Intaktsein der normalen Peptidbindung mit dem **Peptidwasserstoff** —CO—NH—. Dieses freie H in der Peptidbindung selbst scheint für alle normalen Peptidasen als „zweite Anlagerungsstelle" im Sinne der „Zwei-Affinitätstheorie" v. EULER's notwendig zu sein.

Die normalen Dipeptidasen greifen kein Dipeptid an, in dem dieser Peptid-wasserstoff substituirt ist, wie dies eben in der Natur bei den Prolin-peptiden (s. o.) realisirt ist; und auch synthetische Polypeptide, wie Glycyl-sarcosin sind unspaltbar (BERGMANN).

Ein weiteres Erfordernis, das an Modellen für Dipeptidasen sichergestellt ist, ist **freies H** an den beiden Kohlenstoffen, die der Peptidbindung benachbart sind, α und α' (BERGMANN **439**)).

$$\begin{array}{ccc} \alpha' & & \alpha \\ -\mathrm{CH}\cdot\mathrm{CO} & \text{———} & \mathrm{NH}\cdot\mathrm{CH}- \\ | & & | \\ \mathrm{NH_2} & & \mathrm{COOH} \\ & \mathrm{I.} & \end{array} \qquad \begin{array}{ccc} \alpha' & & \alpha \\ \mathrm{CH_2}\cdot\mathrm{CO} & \text{———} & \mathrm{NH}\cdot\mathrm{C} = \mathrm{CH}\cdot\mathrm{C_6H_5} \\ | & & | \\ \mathrm{NH_2} & & \mathrm{COOH} \\ & \mathrm{II.} & \end{array}$$

Es werden also nicht angegriffen Peptide vom Typus des Glycyl-dehydrophenyl-alanins (II); auch hier gibt es wieder Specialfermente in der Niere (**443**). Ebenso werden Peptide nicht oder wesentlich langsamer angegriffen, bei denen das α-Kohlenstoffatom tertiär gebunden ist, wie Glycyl-isovalin (BERGMANN **439**)) oder Glycyl-α-amino-isobuttersäure (LEVENE **444**)), Alanyl-amino-isobuttersäure, Amino-isobutyryl-glycin (**442**). Auch für diese Art der Gruppirung scheint es in der Darmschleimhaut Specialfermente zu geben (ABDERHALDEN **445**)), BERGMANN **439**)). Dagegen ist für die Carboxy-polypeptidase das freie α-H entbehrlich; Spaltung von z. B. Pyruvoyl-d,l-phenyl-alanin (BERGMANN **441**)).

Ungemein wichtig sind einige Befunde BERGMANN's **441**), **442**), die zeigen, daß auch Dipeptide gespalten werden können, die **„unnatürliche" Aminosäuren** enthalten, so z. B. Leucyl-d-alanin und d-Tyrosyl-arginin. BERGMANN zieht daraus den Schluß, daß man nicht die sterische Specifität als solche, also die Zugehörigkeit des Substrats zur l-Reihe, als entscheidend für die Angriffsfähigkeit der Enzyme ansehen darf, sondern daß der gesamte räumliche Bau des Substrates an der Peptidbindung dafür entscheidend ist, ob ein Enzym angreift oder nicht. Der Grund des Nichtangriffs ist eine „sterische Hinderung" ganz allgemeiner Natur, und manchmal ist die Konfiguration eben gerade bei dem „unnatürlichen" optischen Antipoden günstiger. So verwertet BERGMANN auch diese unerwarteten Beobachtungen für seine allgemeine Theorie, auf die wir § 480 eingehen werden.

§ 479a. Affinitätsbeziehungen der einzelnen Proteasen. Mit diesen drei Punkten: freier Peptid-wasserstoff, freies H an den α-C-Atomen und Notwendigkeit eines bestimmten räumlichen Baus an der Peptidbindung, haben wir die Fundamente, auf denen man die Theorie der Spaltung aufbauen kann, wie es BERGMANN **438**) bis **442**) versucht. Darauf kommen wir § 480 zurück, weil wir diese Theorie im Zusammenhang geben wollen, da sie ja auch für den Abbau der Proteine gelten soll. Vorher müssen wir uns aber erst informiren, ob und inwieweit man aus diesen Verhältnissen an definirten Polypeptiden auf die bei Proteinen überhaupt Rückschlüsse ziehen kann.

---

443) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Enz. Spalt. dehydr. Polyp. Zs. phys. Chem., **205**, 65, **207**, 235 (1931/'32). S.A. — 444) ***P. A. Levene, R. E. Steiger, L. W. Bass,*** The rel. of chem. struct. to the rate of hydrol. of peptides. Jl. of Biol. Chem., **81**, 221, **82**, 155, 167 (1929).

Zunächst muß noch das Negative vermerkt werden, daß es kaum möglich ist, bestimmte Gruppirungen von Polypeptiden, die die 3 Bedingungen erfüllen, deswegen von den Baugruppen des Eiweißmoleküls auszusondern, weil sie unspaltbar sind. Es werden vielmehr nach BERGMANN **439)** alle Dipeptide normaler Struktur von Dipeptidasen gespalten, wenn auch z. T. stark verlangsamt. Ob man Carboxyle oder basische Gruppen künstlich anhäuft, oder Phenolgruppen (Tyrosyl-tyrosin) oder endlich stark polare Gruppen kuppelt (Lysyl-asparaginsäure etc.), macht für die Tatsache der Spaltung nur quantitative Unterschiede. Am langsamsten werden Lysyl-asparaginsäure und Lysyl-glutaminsäure gespalten. Bei den synthetischen Substraten der Polypeptidasen, soweit es normale Polypeptide sind, scheint sicheres Material für die Existenz rein strukturell bedingter Resistenzen noch nicht vorzuliegen. Jedenfalls bietet sich nach unseren bisherigen Kenntnissen keine Möglichkeit, aus den Eiweißketten gewisse Kombinationen mit Sicherheit zu verbannen.

Wenn man sich darüber klar werden will, inwieweit man die Befunde an definirten Polypeptiden auf den enzymatischen Angriff der Proteine übertragen kann, so muß man erstens die Vorstellungen über die Affinitäts-beziehungen der Peptidasen zu den Substraten schärfer erfassen; und zweitens erwägen, inwieweit die gleichen Affinitätsbeziehungen bei den langkettigen Proteinen überhaupt in Frage kommen können.

Den ersten Punkt betreffend können wir hier natürlich nur einige principielle Andeutungen geben, soweit sie eben für das generelle Abbauproblem wichtig sind. Die überaus verwickelten Einzelheiten über die Specifität der Peptidasen und die daraus gezogenen Schlüsse über ihre Affinität können wir erst bei den Peptidasen selbst behandeln. Es sind da noch allerlei Probleme offen. So ist es noch nicht sichergestellt, ob zwischen Di- und Amino-polypeptidasen nur die Kettenlänge entscheidet, oder auch verschiedene Affinitäten. Nach der Auffassung von GRASSMANN (l. c. 1, S. 208) ist das letztere der Fall. Dipeptidasen brauchen beides, freies NH_2 und freies COOH, während die Amino-polypeptidase das freie Carboxyl nicht nur nicht braucht, sondern im Gegenteil dadurch gehemmt wird, wenn es der Aminogruppe benachbart ist. Deswegen greift also die Amino-polypeptidase keine freien Dipeptide an, nicht (oder nicht nur) wegen der Kettenlänge. Bei höheren Peptiden ist die entfernter stehende Carboxylgruppe gleichgültig; Dipeptide werden aber von Amino-polypeptidase nur dann angegriffen, wenn man die Carboxylgruppe abdeckt, durch Veresterung oder Amidirung. Wenn sich diese Auffassung allgemein bestätigt — es liegen noch bei den tierischen Peptidasen allerlei Schwierigkeiten vor —, so hätten wir hier ein Gegenstück zu der eben kurz erwähnten Affinität der Carboxy-polypeptidase. Diese auf die freie Carboxylgruppe gerichtete Affinität wird aufgehoben, wenn eine Aminogruppe benachbart ist (BERGMANN **440)**, **441)**); das Enzym greift deshalb normale Dipeptide nicht an, wohl aber solche, deren Aminogruppe nicht mehr intakt ist. Dies gilt für die Methylirung (Sarcosyl-tyrosin, ABDERHALDEN, l. c. 435), oder für den Ausgleich durch die Phenolgruppe (Tyrosyl-tyrosin, BERGMANN), sowie vielleicht für die Acylirung. Fast alle acylirten Dipeptide sind spaltbar (ABDERHALDEN, l. c. 434); aber hier liegen wahrscheinlich besondere Enzyme, Acylasen, vor (§ 444). Daß aber nicht etwa eine Häufung von negativen Gruppen an sich Dipeptide für Carboxy-polypeptidase spaltbar macht, zeigt der Befund BERGMANN's, daß im Gegensatz zum Tyrosyl-tyrosin Tyrosyl-asparaginsäure nicht angegriffen wird. Wie er dies deutet, werden wir erst § 480 bei seiner Theorie des „ersten Angriffs" erläutern können. ABDERHALDEN **446)** fand aber eine Spaltbarkeit durch Trypsin-kinase, d. h. Carboxy-polypeptidase auch für andere Dipeptide, die Tyrosin enthalten, nämlich vom Typus Alanyl-tyrosin. Das Tyrosin scheint tatsächlich eine ganz besondere Rolle zu spielen.

---

445) ***E. Abderhalden, W. Zeisset,*** Unters. über das Verh. von Polypept. etc. Fermentforsch., **13,** 310 (1932). — 446) ***E. Abderhalden, A. Bahn,*** Vergl. Stud. an Hand homologer Dipept. des l-Tyrosins etc. Fermentforsch. **11,** 399 (1930). S.A.

Wir hätten also — von den experimentellen Unsicherheiten hier abgesehen — eine einfache Dreiteilung der Affinitäten ohne Rücksicht auf die Kettenlänge.

Dipeptidasen: Affinität zu beiden der Peptidbindung benachbarten Endgruppen: freies NH_2 und freies Carboxyl. Infolgedessen kein Angriff höherer Peptide von der Aminoseite, da in diesen das freie Carboxyl in der Nachbarschaft fehlt, und keiner von der Carboxylseite, da die freie Aminogruppe fehlt. Kein Angriff irgendwie veränderter Dipeptide (**446**).

Aminopolypeptidasen: Affinität zur freien Aminogruppe, aufgehoben durch benachbartes Carboxyl. Können also alle höheren Gebilde angreifen, die solches benachbartes COOH nicht enthalten, sowie Dipeptide mit aufgehobenem Carboxyl.

Eine Komplikation wird von BERGMANN dadurch hineingebracht, daß er nun seine Prolinpeptidase mit der Amino-polypeptidase identificirt. Dadurch ist er gezwungen, von seinem Hauptgrundsatz abzugehen, daß der „Peptid-wasserstoff" frei sein muß, und für die Amino-polypeptidase einen ganz anderen Mechanismus anzunehmen, als für die anderen Peptidasen, den er formulirt (§ 480). Ob diese Identificirung berechtigt ist, kann uns hier nicht beschäftigen; GRASSMANN (l. c. 2, S. 480) bezweifelt es. Einfacher wäre jedenfalls die Annahme eines Specialenzyms, wie wir sie hier vorläufig acceptirt haben.

Carboxypolypeptidasen haben Affinität zum freien Carboxyl. Sie wird aufgehoben, wenn benachbart eine freie Aminogruppe steht. Die Enzyme dieser Gruppe können also alle höheren Gebilde von der Carboxylseite her angreifen, da hier die Aminogruppen nicht benachbart stehen; sowie Dipeptide, wenn die starke Polarität der Aminogruppe durch Substitution (Alkylirung) oder benachbarte negative Gruppen (Phenol im Tyrosyl-tyrosin) abgeschirmt wird. Die Affinität ändert sich bei Einführung direkt saurer Gruppen (Acyle) und führt schließlich in unklarer Scheidung zu anderen Enzymtypen über, den Acylasen. Auch diese Beziehungen versucht BERGMANN zu formuliren, s. § 480.

Zu diesen beiden Haupttypen von Peptidasen mit Affinitäten zu klar und scharf polaren Gruppen hat nun BERGMANN **447**) kürzlich eine dritte Gruppe neu hinzugefügt, die **Papain-polypeptidase**, die wir S. 594 kurz erwähnt haben, und auf die im Detail bei der Beschreibung der Peptidasen zurückzukommen ist. Sie ist im Papain-HCN enthalten und greift kein normales Substrat der Peptidasen an. Nicht aktivirtes Papain enthält sie nicht in wirksamem Zustande. Sie ist ein besonderes Enzym, vielleicht die gesuchte „**Peptonase**". Es steht zwischen „echten" Peptidasen und Amidasen; es hat Affinität weder zu freiem Carboxyl, noch zu freien Aminogruppen, sondern zu Amidbindungen, und zwar müssen zwei benachbart sein und freien Wasserstoff (Peptid-wasserstoff) enthalten. Eine benachbarte freie Aminogruppe hemmt.

Das Enzym spaltet acylirte Peptide neben der Acyl-amino-bindung, z. B. Benzoyl-diglycin in Glycin + Hippursäure, hat also mit der Hippuricase nichts zu tun. Ferner wird z. B. Hippuryl-lysyl-glycinester gespalten in Hippursäure und Lysyl-glycinester. Bei acylirter ε-Aminogruppe des Lysins wird sowohl die Amidbindung wie die Peptidbindung gelöst, bei einfacheren Amiden wird wieder nur die Amidbindung angegriffen, so wird Hippuryl-amid und α-Benzoyl-lysinamid hier gespalten. Dagegen wird ε-Carbobenzoxy-lysinamid wegen der freien α-Aminogruppe nicht gespalten; ebenso nicht wegen des fehlenden Peptid-H Carbobenzoxy-glycyl-sarcosyl-diglycin. Das Enzym bildet also eine Übergangsform zwischen Peptidasen und Amidasen, speciell den Acylasen. Das Enzym ist mit der Proteinase nicht identisch, läßt sich fraktionirt inaktiviren (Jod, Phenylhydrazin, H_2O_2). Da wahrscheinlich dieses Enzym es ist, das im aktivirten Papain die Peptone spaltet, so könnte hier

---

447) *M. Bergmann c.s.*, Proteol. enz. VI—VIII. Jl. of Biol. Chem., **111**, 225, 245 (249), 659 (1935).

tatsächlich eine wahrhafte „Peptonase" aufgefunden sein; eine weitere Aufklärung wäre von größtem Interesse.

Wenn wir diese Einteilung der Peptidasen aufs Äußerste schematisiren, so kommen wir zu der ganz allgemeinen Annahme, daß es drei Gruppen von Peptidasen für normale Polypeptide gibt, die je nachdem eine Affinität haben zu einer ausgesprochen basischen Gruppe, einer ausgesprochen sauren Gruppe, und zu einer gemischtpoligen, der CO—NH-Gruppe.

Damit hätten wir rein theoretisch die Brücke geschlagen zu den 3 Gruppen der Proteinasen: dem auf basische Proteine wirkenden Pepsin, den auf saure Proteine wirkenden Tryptasen, und den auf ungeladenes Eiweiß wirkenden Papainasen. Man könnte also sehr einfach weiter schließen, daß auch die beiden Haupt-proteinasen an den freien Kettenenden ansetzen, die Pepsinasen am Amino-ende, die Tryptasen am Carboxyl, und nur für die Papainasen könnte man auch nach der Analogie mit ihrer zugehörigen Polypeptidase einen sofortigen Angriff an einer Stelle der Kettenmitte annehmen.

Aber dieser scheinbar so einfache Schluß stimmt nicht mit den Tatsachen überein. Wenn wir von der ganz überraschenden Angabe CALVERY's (l. c. 378) absehen, so ist seit langer Zeit einhellig angenommen, daß Pepsin keinerlei freie Aminosäuren bildet, während es bei den am Kettenende ansetzenden Peptidasen durchweg die Regel ist, daß sie an der dem Angriffspunkt benachbarten Peptidbindung spalten, also Stück für Stück die freien Aminosäuren vom jeweilig immer neu gebildeten Kettenende ablösen. Für Tryptasen ist der direkte Beweis, daß niemals freie Aminosäuren entstehen, also ein analoger Modus wie für die Peptidasen auszuschließen ist, noch nicht in dieser Schärfe geführt; aber alle die hier citirten Angaben über die Zerlegung von Protaminen, Histonen und Ovalbumin mit wirkungsreinen Tryptasen führen doch immer mehr zu der Vorstellung, daß hierbei ebensowenig freie Aminosäuren entstehen, wie bei der Pepsinwirkung, daß vielmehr auch hier ganz ausschließlich noch Peptide entstehen, und daß auch hier das Auftreten freier Aminosäuren nur durch Peptidasenwirkung erfolgen kann. Wir müssen also wohl endgültig damit rechnen, daß die erste Spaltung der Proteine durch Proteinasen niemals an der ersten Peptidbindung erfolgt, sondern an einer mehr nach dem Innern der Kette zu gelegenen Bindung.

Für die Tryptasenwirkung gibt es, auch wenn wir von dem Fehlen freier Aminosäuren nun ganz absehen wollen, einige indirekte Beweise. Erstens gibt es ein hohes Polypeptid, das nach ABDERHALDEN 448) durch Tryptase gespalten wird, und zwar in der Mitte, nämlich Glycyl-d,l-leucyl-glycyl-leucinester (der also überhaupt kein Carboxyl enthält, s. u.). Ein weiteres Argument ist eine Berechnung von LINDERSTRØM-LANG (l. c. 197, S. 454), ausgehend von der heute sichergestellten Tatsache, daß Tryptase aus Clupein Dipeptide abspaltet (§ 477). Beim Abbau allein vom Carboxyl-ende her müßten also diese Dipeptide der Rest der Kette am Amino-Ende sein; das ist aber ganz unmöglich, da zu wenig Bindungen dafür gelöst werden (4,4 mg Aequiv. COOH von im Ganzen 7). Dabei müßte zum mindesten noch ein Pentapeptid resultiren.

Mit der Verlegung der ersten Spaltung vom Kettenende weg stehen wir dann vor der neuen Frage, wo diese erfolgt. Sie kann in weitem Abstande von den Kettenenden erfolgen, dann entstehen also grundsätzlich große Bruchstücke, und sie kann in der Nähe des Kettenendes erfolgen, dann haben wir immer noch einen stufenweisen Abbau, indem von der Hauptkette

---

448) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Zum Problem der spezif. Einstellung der Polypeptidasen. Fermentforsch., **12**, 432 (1931). S.A.

Di- und Tripeptide abgelöst werden. Bei der Tryptase ist angesichts der kurzen Zeit, seitdem man über wirkungsreine Proteinase verfügen kann, diese Frage für die eigentlichen Proteine noch nicht zielbewußt gestellt, geschweige denn beantwortet worden; beim Clupein ist nunmehr die alleinige Entstehung von Di- und Tripeptiden als gesichert anzusehen. Für die Pepsinasen neigte man sich wegen der Existenz der noch immer durch Tryptasen angreifbaren Peptone zu der Annahme, daß sie principiell nur — oder betont — so wirken, daß sie das große Molekül an wenigen besonders reaktionsfähigen Stellen in noch große Bruchstücke auseinanderschlagen. Als solche Stellen boten sich wie erwähnt die Cystin- und die Tyrosinbindungen dar. Es scheint aber nicht oder nicht immer so zu sein. So neigen Waldschmidt-Leitz und Calvery (l. c. 397) für das reine Ovalbumin zu der Annahme, daß die Pepsinspaltung bereits in der Hauptsache zu Tripeptiden führt. Allerdings liegen hier, wie es scheint, besondere Verhältnisse vor, denn hier führt die Pepsinwirkung so weit, wie überhaupt die Proteinasenwirkung führen kann; d. h. Tryptase führt an sich bis zu demselben Spaltungsgrad (aber anderen Produkten), und führt nach Pepsin nicht darüber hinaus.

Wir können die Dinge also noch nicht durchschauen, aber es ist immerhin möglich, daß bei wirklich zu Ende geführter Proteinasenwirkung überall nur noch Di- oder Tripeptide vorliegen, die systematisch von der Hauptkette abgespalten sind. Diese Überlegung hat einen gewissen theoretischen Wert. Denn dann könnte man immer noch, wenn auch mit etwas Zwang, daran festhalten, daß die Proteinasen ihre Affinität auf die freien Endgruppen richten, wie die Peptidasen. Man könnte die Hypothese aufstellen, daß zwar das Enzym sich an die Endgruppe bindet, die Spaltung aber — vielleicht infolge der räumlichen anderen Lagerung der Proteinkette — nicht wie bei den Polypeptiden an der nächsten Peptidbindung erfolgt, sondern an der zweiten oder gar dritten.

Für diese Hypothese spricht bisher kein experimenteller Befund, was aber bei der allgemeinen Unkenntnis über die Struktur der Ketten nichts besagen will. Dagegen sprechen einige Befunde, die für Tryptase einen Angriff nachweisen, wenn garkein Carboxyl am Kettenende vorhanden ist. Dies sind die soeben erwähnte Spaltung eines Tetrapeptid-esters durch Tryptase (Abderhalden, l. c. 448), ferner die Spaltbarkeit der Ester des Clupeins durch ganz reine Tryptase (Weil, l. c. 235a). Ferner sei noch erwähnt, daß Bergmann (l. c. 202) ein synthetisches Substrat für reine Tryptase gefunden hat, das ebenfalls nur ein verestertes Carboxyl am Kettenende besitzt, den Carbobenzoxy-glycyl-glutaminyl-glycin-aethylester.

Wenn man also bis zum Beweis ihrer Brauchbarkeit diese etwas gezwungene Hypothese ablehnen will, so bleibt nur die andere Annahme, daß nicht nur die Spaltung, sondern auch die Bindung der Proteinasen — auch abgesehen vom Papain, wo wir dies ohnehin mit Bergmann (l. c. 447) annehmen — nichts mit den Kettenenden zu tun hat, sondern daß auch der **primäre Angriffspunkt in die Ketten selbst** zu verlegen ist. Dann haben wir zwei Möglichkeiten zur Auswahl: entweder das Enzym hat seine eigentliche Affinität zur Peptidbindung selbst, der CO—NH-Bindung. Dies ist eben nach Bergmann der Fall für das Papain, das wahrscheinlich — nach Analogie mit seiner zugehörigen Polypeptidase — zwei benachbarte Amidbindungen braucht und in jeder Proteinkette vorfindet.

Für die so eindeutig polar gerichteten Pepsinasen und Tryptasen wird man sich zu dieser Annahme nicht leicht entschließen können, und dann bleibt nur die mehrfach, insbesondere von Waldschmidt-Leitz vertretene und von Linderstrøm-Lang (l. c. 197) ausführlich behandelte Annahme, daß es die **polaren Seitenketten der Aminosäuren** in den Ketten sind, an denen die Proteinasen ansetzen. Schematisch eben die Tryptasen an negativen Gruppen, vor Allem also den Dicarbonsäuren und dem Tyrosin, die Pepsinasen am Lysin, Arginin, Histidin etc. Ein Angriff an nicht polaren Seiten-

ketten, wie etwa Leucin, Phenyl-alanin scheint dagegen ganz zurückzutreten. Diese Hypothese hat weite Ausblicke und ist wahrscheinlich im Princip der richtige Weg. Aber ihre Ausdeutung im Einzelnen macht noch viele Schwierigkeiten, ganz abgesehen davon, daß sie in der Deutung des Grundproblems, warum die Peptidasen kein Protein angreifen, noch nicht weiter führt.

Sie ist z. B. imstande, die weitgehende Fermentresistenz des Seidenkristalls zu erklären, der ja nur aus Glycin und Alanin besteht und deswegen wohl eben primär den Proteinasen überhaupt keinen Angriffspunkt darbietet.

Aber sie läßt zunächst principiell die Frage offen, warum denn die Proteinasen, wenn sie Affinität zu den polaren Gruppen haben, nicht auch an den Endgruppen haften können, führt also auf Umwegen wieder zu der Frage nach der besonderen Gestaltung der Endgruppen zurück (§ 476). Weiterhin würde eine konsequente Durchführung dieser Annahme dahin führen, daß die Spaltung etwa durch Tryptase abhängig ist von der Zahl und Verteilung der sauren Seitenketten; und da diese sehr verschieden in den Proteinen verteilt sind, müßte man bestimmte Regelmäßigkeiten auffinden können.

Endlich macht auch die direkte Auswahl der polaren Gruppen noch erhebliche Schwierigkeiten. Als wichtigstes Beispiel — weil es am häufigsten beobachtet ist — sei nur die Rolle des Tyrosins genannt. An sich sollte es als saures Phenol den bevorzugten Angriffspunkt der Tryptase bilden, was auch wohl der Fall ist (vgl. Kiesel, l. c. 399a); wir haben aber wiederholt darauf hingewiesen, daß es anscheinend mindestens ebenso wichtig ist für den Angriff des Pepsins (§ 478a). Dagegen ist ein Zusammenhang der basischen Seitenketten mit dem Pepsinangriff bisher nirgends klar ersichtlich, und die stark basischen Protamine sind gegen Pepsin gerade resistent, vielleicht gerade deshalb, weil ihnen das Tyrosin fehlt, das in den durch Pepsin spaltbaren Histonen vorhanden ist, die auch noch Glutaminsäure enthalten. Andererseits sieht Linderstrøm-Lang den Angriffspunkt der Tryptase im Clupein gerade im Arginin, die Spaltung soll zwischen 2 Arginin-resten erfolgen, was nunmehr Waldschmidt-Leitz (l. c. 245a) sichergestellt hat. Hier liegen also noch allerlei fundamental wichtige Einzelprobleme vor. Kann man diese Hypothese auch im Einzelnen sicherstellen, so ist es kaum zweifelhaft, daß man gerade dadurch auch der Frage der Verteilung der einzelnen Baugruppen in den Proteinen näher kommen kann.

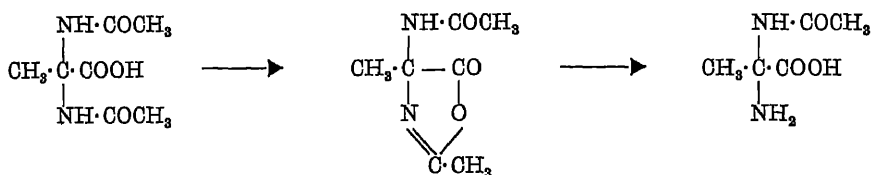
b) Der erste Angriff und die Theorie der Spaltung.

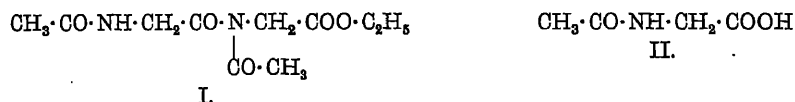
§ 480. Der erste Angriff der specifischen Fermente auf Polypeptide wie auf Proteine beruht auch hier sicherlich zunächst auf einer Anlagerung des Enzyms und Ausbildung einer Enzym-substratverbindung. Gleichgültig, ob die Hauptanlagerungsstelle die Peptidbindung selbst ist oder eine in ihrer Nähe befindliche besondere Anheftungsgruppe, in jedem Falle tritt eine Verschiebung der Valenzen auf, die zu einer Zerfallsbereitschaft der Peptidbindung führt, so daß nun die betr. Ionen, H^+ oder OH^- in der neu entstandenen Verbindung andere Wirkungsbedingungen vorfinden. Eine einfache Verstärkung einer OH-Ionen Katalyse tritt nicht ein, wie Abderhalden **449)** insbesondere daraus erschließt, daß sich in zahlreichen Fällen Polypeptide gegen Alkali und Enzyme völlig verschieden verhalten; manche sind leicht durch Alkali, langsam durch Enzyme spaltbar, andere umgekehrt.

Für solche Lockerungen an der CO-NH-Bindung hat Bergmann **450)** Modellreaktionen angegeben. Z.B. wird α, α-Diacetamino-propionsäure nach Überführung in das Azlacton bereits in der Kälte unter Abspaltung des einen Essigsäurerestes zerlegt:

---

449) ***E. Abderhalden, M. Saito,*** Einw. von n-Alkali etc. auf ... Polypeptide. Fermentforsch. **11,** 539 (1930). — 450) ***M. Bergmann, K. Grafe,*** Z.K. der Peptidbindung. Zs. phys. Chem., **187,** 183 (1930).

$$\begin{array}{c} NH\cdot COCH_3 \\ | \\ CH_3\cdot C\cdot COOH \\ | \\ NH\cdot COCH_3 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} NH\cdot COCH_3 \\ | \\ CH_3\cdot C - CO \\ | \quad\quad | \\ N \quad\quad O \\ \diagdown \diagup \\ C\cdot CH_3 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} NH\cdot COCH_3 \\ | \\ CH_3\cdot C\cdot COOH \\ | \\ NH_2 \end{array}$$

Er schließt daraus, daß auch bei der Enzymwirkung zuerst Oxazolringe entstehen könnten. Ein anderes Beispiel ist die sehr große Labilität der Peptidbindung, wenn man sie am Amid-N acylirt. BERGMANN 451) erhielt aus Diacetyl-dioxo-piperazin in alkoholischer Lösung mit Arginin als Katalysator durch Aufsprengung des Ringes Diacetyl-glycyl-glycin-äthylester (I), der durch Basen zerfällt unter Aufsprengung der Peptidbindung in Acetursäure (II).

$$\underset{\text{I.}}{CH_3\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot CO\cdot \underset{|\atop CO\cdot CH_3}{N}\cdot CH_2\cdot COO\cdot C_2H_5} \qquad \underset{\text{II.}}{CH_3\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH}$$

Aus diesen allgemeinen Erwägungen ist nun die specielle Theorie BERGMANN's (l. c. 439—442) erwachsen, die er experimentell mit Hilfe der zahlreichen von ihm neu hergestellten Polypeptide mit besonders ausgeprägten Merkmalen geprüft hat. Die Bedingungen, die nach diesen Versuchen für die Spaltbarkeit überhaupt und für die Spaltbarkeit durch die einzelnen Peptidasen maßgeblich sind, haben wir rein systematisch § 479b vorausgeschickt, um hier das Bild der reinen Theorie nicht durch Einzelheiten zu verwirren. Es sind, um es kurz zu wiederholen drei: das Vorhandensein des Peptidwasserstoffes, das — nicht absolut notwendige — Vorhandensein von freiem H an den beiden α-C, und der räumliche Bau um die Peptidbindung herum, der nicht unbedingt übereinstimmen muß mit der Konfiguration der l-Reihe, wenn dies auch ganz überwiegend, und bei den Proteinen stets der Fall ist. Die wenigen Fälle, in denen optische Antipoden gespalten werden, dienen BERGMANN nur als Belege für seine räumlichen Vorstellungen.

Der Ausgangspunkt der Theorie ist natürlich die „Lockerung" der Peptidbindung—CO—NH—, die der verstärkten Zerfallsbereitschaft zu Grunde liegt. Da der Peptid-wasserstoff für alle Dipeptidasen nötig ist, und wenn die Prolinpeptidase nicht mit der Aminopolypeptidase identisch, sondern ein Specialferment ist (s. o.), für alle Peptidasen nötig ist, so ist die erste These:

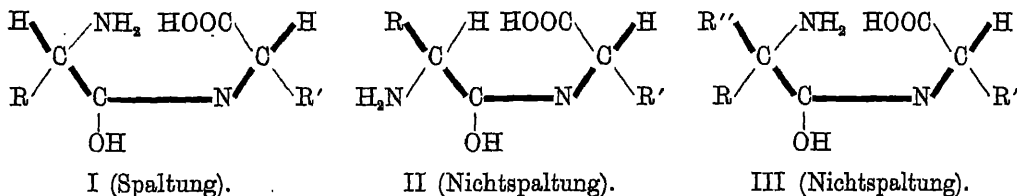
Der erste Angriff der Peptidbindung unter dem Einfluß des Fermentes ist eine **Umlagerung der normalen Amidbindung in die Imid-bindung der Enolform** —CO—NH— ⟶ —C(OH)=N—. Dafür ist eben der Peptidwasserstoff unentbehrlich. Die Bedingung dafür ist bei den Dipeptidasen, für welche diese grundsätzliche Formulirung zunächst gilt, die gleichzeitige **Bindung des Enzyms an die freie Aminogruppe, das freie Carboxyl und die dazwischen eingebettete Peptidbindung**. Dafür ist es notwendig, daß **COOH und NH_2 räumlich nahe beieinander stehen.**

Die Keto-Enol-verschiebung erfolgt gleichzeitig mit der Enzymbindung, so daß wir die zur Spaltung des Substrates geeignete Konfiguration gleich mit der Enol-bindung aufzeichnen wollen. Wenn der Forderung genüge getan sein soll, daß das Enzym sich außer an die Peptidbindung auch an COOH und NH_2 binden kann, so muß das Substrat räumlich die Form eines Sechsecks annehmen; und die Anlagerung des Enzyms an die benachbarten Gruppen muß

---

451) ***M. Bergmann, V. du Vigneaud, L. Zervas,*** Acylwanderung etc. bei acyl. Dioxopiperaz. Ber. Chem. Ges. **62**, 1909 (1929). S.A.

diese Konfiguration noch stabilisiren. Wir haben also eine *bestimmte Konfiguration*, die geeignet ist für den Enzymangriff, und die BERGMANN als I in der Projectionsformel zeichnet, die nicht nur die cis-Stellung von NH_2 und COOH, sondern auch die optische Isomerie berücksichtigt (zwischen C und N Doppelbindung; die fetten Striche bedeuten, daß die Peptidbindung und die beiden H *vor* der Ebene des Papiers liegen).

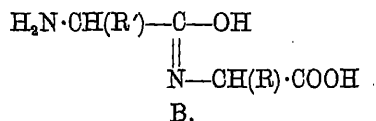
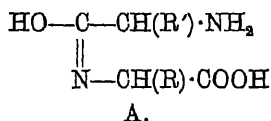
```
H\  /NH2 HOOC\  /H      R\  /H HOOC\  /H        R''\  /NH2 HOOC\  /H
   C           C           C          C              C           C
R/  \C--------N/  \R'   H2N/  \C-------N/  \R'     R/  \C--------N/  \R'
     |                         |                         |
     OH                        OH                        OH
  I (Spaltung).          II (Nichtspaltung).        III (Nichtspaltung).
```

Nur diese Art der Konfiguration ermöglicht die nahe Nachbarschaft der beiden polaren Anheftungsstellen; jede andere Gruppirung, wie etwa II, reißt die polaren Gruppen auseinander und macht das *Substrat unspaltbar*.

Es ist also der räumliche Bau bei allen „natürlichen" Dipeptiden derartig, daß *stets* die beiden H auf der einen (vorderen), die beiden R auf der anderen (hinteren) Seite des Sechsecks liegen. Die R *verhindern* durch ihr Volumen den Zutritt des Enzyms zu dieser Seite der Bindung; es kann sich nur an der einen Seite, wo NH_2 und COOH stehen, anlagern. Die Bedeutung der **freien H** an den α-C ist also ebenfalls nur *räumlich* zu verstehen: ihr kleines Volumen ermöglicht den Zutritt des Enzyms, Besetzung des H verlangsamt die Spaltung oder hebt sie auf (III), also bei allen *tertiären Aminosäuren*, während Art und Größe der beiden R keinen Einfluß auf die Spaltbarkeit hat (GRASSMANN, l. c. 302, § 501).

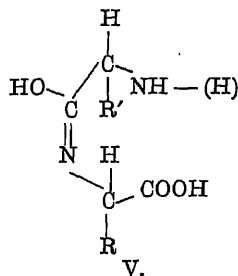
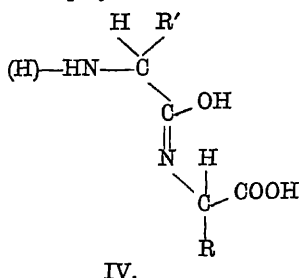
Dies erklärt weiterhin, weshalb die freien H nicht für alle Peptidasen nötig sind, so nicht für Carboxy-polypeptidase. Es erklärt weiterhin, weshalb einige *„unnatürliche" Dipeptide* gespalten werden, denn bei diesen ist die Stellung der R so wie bei den gewöhnlichen, z. B. beim *Leucyl-d-alanin*. In den meisten Fällen stehen aber bei unnatürlichen Dipeptiden die R falsch, so daß die Spaltung sterisch gehindert wird; und wenn (bei diesen) $R = C_4H_9$ oder größer ist, hört die Spaltbarkeit ganz auf, so beim *d-Leucyl-glycin*.

Für die **Carboxypolypeptidase** im Hinblick auf *Dipeptide* ist entscheidend nur das Carboxyl-ende: hier darf kein optischer Antipode stehen, d. h. das H am α-C ist nicht nur an sich nötig, sondern auch seine richtige *räumliche Position*. Dagegen ist das H am α'-C weder an sich notwendig, noch seine räumliche Stellung von Belang: es werden sowohl l-Tyrosyl l-tyrosin wie d-Tyrosyl-l-arginin gespalten.

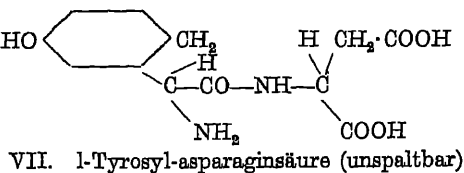
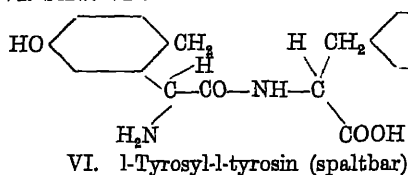
Wichtig dagegen ist die gegenseitige Beeinflussung von COOH und dem Aminoende; ist dieses frei, so wirkt die Carboxy-polypeptidase nicht. Es liegt dann die Stellung A vor. Alkylirung der Aminogruppe beseitigt diese Störung natürlich, aber es genügt auch Abschwächung der Anziehung durch den Oxyphenyl-rest, wobei die günstigere Stellung B gegeben ist; so wird z. B. l-Tyrosyl-l-tyrosin gespalten.

```
HO—C—CH(R')·NH2                 H2N·CH(R')—C—OH
   ||                                      ||
   N—CH(R)·COOH                            N—CH(R)·COOH
      A.                                      B.
```

Dieselbe räumliche Stellung kann eintreten, wenn die Aminogruppe einem Antipoden angehört; Spaltung von d-Tyrosyl-l-arginin. Führt man aber in ein an sich unspaltbares Tyrosyl-peptid noch eine COOH-Gruppe ein, so erfolgt keine Spaltbarkeit: *Tyrosyl-asparaginsäure*.

BERGMANN formulirt dies wie folgt: für jede Wirksamkeit der Carboxy-polypeptidase ist die Konfiguration IV nötig, bei V ist die Beziehung zwischen dem COOH und der basischen Gruppe NH — zu eng, die Spaltbarkeit hört auf. Bei Dipeptiden ist also — NH— = NH—H = NH_2 (auch diese Formeln sind projicirt zu betrachten: „oben" bedeutet „vorn").

```
         H  R'                                   H
          \/                                     |
(H)—HN—— C                                      /C\
          \                               HO\  / |  NH — (H)
           C— OH                              C  R'
           ‖                                  ‖
           N  H                               N  H
            \ |                                \ |
             C— COOH                            C— COOH
             |                                  |
             R                                  R
      IV.                                         V.
```

Den beiden genannten Dipeptiden gibt er die dementsprechend geschriebenen Raumformeln VI. bezw. VII.

```
HO<      >CH2    H CH2<      >OH     HO<      >CH2     H CH2·COOH
           /H     \/                             /H      \/
          \C—CO—NH—C                            \C—CO—NH—C
          /         \                            \        \
       H2N           COOH                         NH2      COOH
```

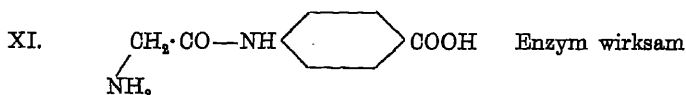
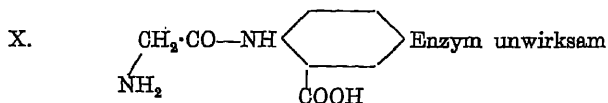
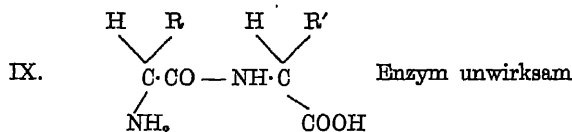
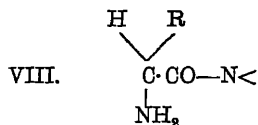
VI. l-Tyrosyl-l-tyrosin (spaltbar)   VII. l-Tyrosyl-asparaginsäure (unspaltbar)

Im ersteren Fall wird also die NH-Gruppe durch die negativ geladene Oxyphenyl-gruppe abgelenkt, im zweiten durch die beiden COOH-Gruppen angezogen, so daß die Carboxy-polypeptidase gehemmt wird.

Aminopolypeptidase soll ganz anders wirken als die beiden bisher genannten Peptidasen. Aber das liegt nur daran, daß BERGMANN 440) daran festhält, daß sie mit der Prolin-peptidase identisch ist. Dann muß er nämlich für die ganze Gruppe der Amino-polypeptidasen seinen wichtigsten Grundsatz aufgeben, daß der freie Peptidwasserstoff notwendig ist (s. S. 698). Nach seiner Formulirung braucht Aminopolypeptidase nichts weiter als die Konfiguration VIII:

```
         H   R
          \ /
VIII.      C·CO—N<
           |
           NH2

         H   R      H   R'
          \ /        \ /
IX.        C·CO — NH·C            Enzym unwirksam
          /           \
        NH2            COOH

X.        CH2·CO—NH<      >       Enzym unwirksam
         /          |
       NH2          COOH

XI.       CH2·CO—NH<      >COOH   Enzym wirksam
         /
       NH2
```

Eine Carboxylgruppe ist nicht notwendig, sondern hebt, wenn benachbart, die Wirkung auf (IX), deswegen spaltet Aminopolypeptidase nicht die normalen Dipeptide, auch nicht

Glycyl-o-aminobenzoesäure (X). Ist aber das COOH weiter entfernt, hört die Störung auf: schon Glycyl-p-aminobenzoesäure (XI) ist spaltbar *), ebenso natürlich die höheren Polypeptide, bei denen das COOH weiter entfernt ist.

Ein interessanter Rückschluß auf die Tryptase-wirkung sei hier noch erwähnt. Man ist ja an sich geneigt, diese Wirkung eher mit der der Carboxy-polypeptidase in Parallele zu setzen. Aber jedenfalls kann sie nicht irgendwie mit der Amino-polypeptidase in Beziehung gebracht werden. Denn Tryptase löst nach BERGMANN nicht die Prolin-peptid-bindungen im Glutin (§ 477a), wie es eben die Prolin-peptidase gleich Amino-polypeptidase tut.

Die **Papain-Polypeptidase** BERGMANN's im Papain-HCN (l. c. 447) muß ganz andere Wirkungsbedingungen haben als alle anderen, denn dieses Präparat greift kein normales Substrat der Peptidasen an. Sie braucht weder ein Carboxyl, noch eine freie Aminogruppe; eine freie Aminogruppe in unmittelbarer Nachbarschaft hemmt; z. B. wird ε-Carbobenzoxy-lysinamid nicht gespalten. Das Enzym braucht nichts weiter als zwei benachbarte Säure-amidgruppen, von denen dann eine gespalten wird. Der Peptid-wasserstoff muß frei sein, sonst ist es gleichgültig, ob es eine volle Peptidbindung ist oder eine einfache Säure-amidbindung; letztere wird bei der Spaltung bevorzugt, z. B. im Hippuryl-amid und α-Carbobenzoxy-lysinamid.

3) Enzymatische Synthesen.

§ 481. Von einer Reversion der Proteasenwirkung war im H.W. nur beim Pepsin ernstlich die Rede, und deshalb haben wir dies Thema eigentlich nur dort unter dem Stichwort **Plasteinreaktion** §§ 563 ff. behandelt. Eine endgültige Lösung dieses Problems steht auch heute noch aus in dem Sinne, daß zwar sowohl die Reversion des Prozesses, wie auch das Auftreten schwer löslicher Phasen, eben der Plasteine, erwiesen sind, aber nicht der Zusammenhang beider Dinge, mit anderen Worten nicht, daß das „Plastein" das Produkt der Synthese ist; es ist dies sogar unwahrscheinlich. Eine wahre Synthese durch andere Proteinasen ist auch heute noch nicht mit Sicherheit bekannt.

Es liegen indessen einige Angaben dazu vor, und da außerdem bereits die älteren Arbeiten eine Plasteinbildung auch durch „Trypsin" in Pepsin-verdauungsgemischen angegeben haben (H.W. S. 976), so ist es zweckmäßiger, hier neben einer kurzen Beschreibung der „Plasteine" als Substanzen einen Überblick über die Grundfrage der **Reversibilität der Proteasenwirkung** überhaupt zu geben. Die Frage ist ganz abgesehen von ihrer hohen theoretischen Bedeutung auch praktisch für die enzymatische Analyse des Eiweißabbaus von großer Wichtigkeit. Eine rückläufige Synthese während des enzymatischen Stufenabbaus könnte ganz falsche Zahlenverhältnisse vortäuschen; und auch die rein chemische Analyse des Proteinabbaus würde ihre Grundlage einbüßen, wenn wir mit der Möglichkeit rechnen müßten, daß die nachgewiesenen Produkte nicht auf dem Abbauwege liegen, sondern synthetisch entstanden sein könnten. Die Möglichkeit liegt vor, aber die Größenordnung der Fehler ist schon nach älteren Arbeiten (HENRIQUES und GJALDBAEK, *l. c. 790*), ebenso wie nach den neueren Untersuchungen gering, wenn man, wie bei Abbauversuchen üblich, in verdünnten Lösungen arbeitet (vgl. die kritische Stellungnahme dazu bei LINDERSTRØM-LANG, l. c. 197).

Der einzige Nachweis der **synthetischen Wirkung an sich** ist das Verschwinden vorher frei gewesener Aminogruppen; dieser Nachweis ist schon im H.W. § 565 als erbracht angesehen worden und seitdem mehrfach — für Pepsin — bestätigt und durch den Nachweis ergänzt, daß auch Carboxyle in aequivalenter Menge verschwinden

*) Dieser Befund konnte von GRASSMANN (l. c. 302, § 501) nicht bestätigt werden, s. a. § 502.

(WASTENEYS und BORSOOK c.s. 452)—456), RONA c.s. 457), CUTHBERTSON 458), SARLUY 459)).

Den **Umfang dieser Synthese** in 11 Tagen gaben HENRIQUES und GJALDBAEK zu etwa 4 % an, bei einer 30 %igen Lösung von pepsinverdautem Eiweiß. CUTHBERTSON **458)** fand (Casein in 25 %iger Lösung) in 48 h bei 4 g Gesamt-N eine Abnahme von 0,084 g N. Bei niederen Konzentrationen muß die Reversion naturgemäß viel geringer sein. Einen absoluten Wert haben diese Zahlen ohnehin nicht, da sie ja nur die Differenz zwischen dem Ergebnis der entgegengesetzt gerichteten Prozesse der Spaltung und Synthese angeben können.

Der **opt. ph** dieser Synthese durch Pepsin wird zu 4,0 angegeben (**452**), III); mehrfach bestätigt.

Nehmen wir also die Tatsache als gegeben an, daß neue Peptidbindungen geschlossen werden, so ist damit noch nicht im Entferntesten ausgesagt, daß der Prozeß geradlinig reversibel ist in dem Sinne, daß wieder ein Protein aus den Abbauprodukten der Pepsinwirkung entsteht, und noch viel weniger, daß nun etwa dasselbe Protein gebildet wird. Selbst wenn man annehmen könnte, daß das ausfallende Plastein selbst das Reversionsprodukt ist, so sprächen seine Eigenschaften und seine Schwerlöslichkeit viel mehr für ein anderes proteinähnliches Gebilde. Daß es physiologisch als vollwertiges „Eiweiß" ausgenutzt wird (BEARD **460**)), gibt keine nähere Erklärung.

Von dem Material, daß WASTENEYS und BORSOOK zur Stütze ihrer Annahme geben, daß das Plastein ein synthetisch gebildetes Protein, ein den **denaturirten Proteinen** ähnliches Gebilde ist, seien einige wichtigere Angaben citirt. In 40 %iger Lösung von Ovalbumin entsteht bei ph = 4 mit Pepsin ein Niederschlag, bis zu 39 % Ausbeute, der weniger freies NH_2 enthält als das Abbauprodukt. Das Plastein entsteht aus allen Anteilen der Verdauungsflüßigkeit in derselben Relation, wie sie entstanden sind. Gibt die für Proteine charakteristische Biuretreaktion, wird durch Trichloressigsäure gefällt. Unlöslich bei ph = 2—7, löslich bei > 8,8. Pepsin verdaut es schnell. Bei ph > 5,4, sowie bei Konzentrationen unter 5 % tritt keine Synthese ein, in verdünnten Lösungen erfolgt nur Hydrolyse (I, IV). Mit steigender Temperatur Verstärkung der Synthese, bis zu 72°, dann plötzlicher Stillstand wegen Vernichtung des Enzyms (II). Plastein sowohl wie genuines Protein hemmen die Synthese (IV). Auch Trypsin bildet Plastein aus Pepsin-abbaugemischen, opt. ph 5,7 (s. u.) (V). Genauere Untersuchung der Abhängigkeit des Verhältnisses von Hydrolyse und Synthese bei verschiedenen Temperaturen und Konzentrationen ergibt als optimale Bedingungen bei ph = 1,6 eine Enzymkonzentration von 1 Pepsin : 18 Protein und 40° (MORELL c.s. **453**)). (Begründung, daß die beobachtete Verlangsamung der Hydrolyse eben auf dieser „*backward reaction*" beruht). Die Synthese wird umso geringfügiger, je länger das Pepsin gewirkt hat (**454**), es bildet sich ein Gleichgewichtszustand aus, bei dem die Synthese stillsteht. Dieses Aufhören der Synthese beruht nicht auf einer Zerstörung des Enzyms, sondern auf seiner Adsorption an das Plastein, die rückgängig gemacht werden kann (**456**). Die Plasteinbildung durch Trypsin soll durch Lipoide beschleunigt werden (MARSTON **461**)).

---

452) ***H. Wasteneys, H. Borsook,*** Enzym. Synth. of proteins I—V. Jl. of Biol. Chem., **62**, 15, 633, 675, **68**, 563, 575 (1924/5). — 453) ***C. A. Morell, H. Borsook, H. Wasteneys,*** Infl. of the backward react. in the pept. hydrol. of albumin. Jl. of gen. Phys., 8, 601 (1927). — 454) ***H. Borsook, D. A. MacFadyen, H. Wasteneys,*** Substrate in peptic synth. of protein. Jl. of gen. Phys., 13, 295 (1929/30). — 455) ***H. Wasteneys,*** Protein Synthesis. Biol. Bull., **60**, 1 (1931); BPh 61, 298. — 456) ***H. Wasteneys, B. F. Crocker,*** Equil. point in pept. synth. Trans. Roy. Soc. Canada (III), **25**, V., 199 (1931). — 457) ***P. Rona, Fr. Chrometzka, H. A. Oelkers,*** Ferm. Eiweißsynth. Bioch. Zs., **189**, 249 (1927), **208**, 298 (1928). — 458) ***D. P. Cuthbertson, S. L. Tompsett,*** Enzym. Synth. of proteins etc. Biochem. Jl., **25**, 2004 (1931). — 459) ***A. Sarluy,*** Revers. of protein hydrol. Arch. Néerland. de phys., **16**, 136 (1931); Chem. Weekblad, **28**, 515 (1931). — 460) ***H. H. Beard,*** Nutritive value of plastein. Jl. of Biol. Chem., **71**, 477 (1927). — 461) ***H. R. Marston,*** Accel. of enz. synth. of proteins by lip. emuls. Austr. Jl. exp. Biol., **3**, 233 (1926); BPh **40**, 586.

Glutin liefert kein Plastein, Caseinogen wenig (CUTHBERTSON 458)) oder keins (RONA 457)). Wichtig ist der Hinweis (CUTHBERTSON), daß dies augenscheinlich mit dem Cystingehalt zusammenhängt (reichlich im Serum- und Ovalbumin, wenig im Caseinogen, garkeins im Glutin); Plastein ist reich an Cystin. Dieselbe Überlegung gilt für den Gehalt an Kohlenhydrat, das sich bei Caseinogen im Plastein anreichert. — BLAGOWESTSCHENSKI 462) hat erneut Plasteine aus Ovalbumin, Caseinogen und pflanzlichen Globulinen untersucht. Die Ausbeute beträgt auf N berechnet ca. 25 %. Sie enthalten weniger Gesamt-N als das Ausgangsprotein, aber mehr NH_3 und mehr Amino-N.

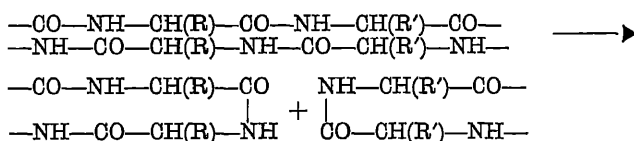
Bei allen diesen Untersuchungen fehlt aber eben die Hauptsache, nämlich der sichere Nachweis, daß zwischen der „Synthese", nachgewiesen durch Verschwinden freier Endglieder, und dem Auftreten des durch Trichloressigsäure fällbaren Produkts „Plastein", ein Zusammenhang insofern besteht, daß hier eine Eiweiß-synthese stattfindet.

ODA 463) gibt an, daß nach 2 Tagen der durch Trichloressigsäure fällbare Anteil zunimmt, ohne daß das freie NH_2-N abnimmt. Wichtiger sind die Angaben, daß auch Trypsin in Pepsin-abbaugemischen ein Plastein bildet, ohne daß eine Synthese auftritt. Die Plasteinbildung durch Trypsin fanden HENRIQUES und GJALDBAEK (H. W. S. 976); WASTENEYS (V) hat sie bestätigt. Sie nahmen eine Hydrolyse neben einer Synthese an; es tritt Tyrosin auf; nach RONA 457) aber findet garkeine Synthese, sondern nur Hydrolyse statt, COOH nimmt zu.

Andererseits ist nach FOLLEY 464) das Plastein überhaupt kein „Protein", sondern ein Gemisch von Abbauprodukten, von denen er durch die Phenylisocyanate mindestens zwei nachweisen konnte. „Plastein" hat ein Molgewicht von ca. 1000, enthält aber weniger Amid-N und mehr Amino-N als das Protein, von dem man ausgegangen ist. Die Synthese beschränkt sich also wahrscheinlich auf das Verschwinden von freien Kettenenden, ohne daß eine nennenswerte Erhöhung des gesamten Molgewichtes erfolgt.

Dafür kann man sich verschiedene Möglichkeiten denken, z.B. Zerfall von Ketten mit neuen Bindungen in anderer Form, so daß neue Kettentypen entstehen, nach LINDERSTRØM-LANG (l. c. 197) etwa:

```
—CO—NH—CH(R)—CO—NH—CH(R')—CO—        ——▸
—NH—CO—CH(R)—NH—CO—CH(R')—NH—

—CO—NH—CH(R)—CO      NH—CH(R')—CO—
              |   +  |
—NH—CO—CH(R)—NH      CO—CH(R')—NH—
```

Oder es können aus den eingerollten Ketten (§ 476a), nämlich durch Umwandlung der Nebenvalenzen in Hauptvalenzen, aus den „Scheinringen" echte Ringe von Dioxo-piperazincharakter entstehen, wobei für jeden Ring die Kette um 3 C verkürzt wird; es können schließlich auch fertige Dipeptide nachträglich zu Dioxo-piperazinen werden. Die beiden ersten Fälle verlaufen ohne Veränderung der Anzahl freier Endgruppen, könnten aber bei höheren Bruchstücken für das physikochemische Verhalten, d. h. die Plasteinbildung verantwortlich sein. Die Umbildung von Dipeptiden in Anhydride läßt umgekehrt NH_2 und COOH verschwinden. Die Frage der Bildung von Dioxopiperazinen bei der enzymatischen Hydrolyse ist trotz einiger diesbezüglicher Behauptungen (vgl. BLANCHETIÈRE **464a**)) nicht geklärt, s. § 471. Wir wollen darauf nicht weiter eingehen.

Die ganze Sachlage wird dadurch erschwert, daß eigentlich nur beim Pepsin dieses Verschwinden freier Endgruppen sichergestellt ist. Dadurch wird die Grundfrage, ob bei einfachsten Baugruppen Reversionen möglich sind, im Dunkeln gelassen. Eine **enzymatische Synthese von Polypeptiden** ist noch nicht erwiesen; das Gebiet ist sonderbarer Weise kaum bearbeitet.

462) ***A. W. Blagowestschenski, G. W. Jeremejew,*** Z. K. der Plasteine. Bioch. Zs., **270,** 66 (1934). — 463) ***T. Oda,*** Synth. Wirk. des Pepsins. Jl. of Biochem., **6,** 77 (1926). S. A. — 464) ***S. J. Folley,*** Nature of plasteins. Biochem. Jl., **26,** 99 (1932). — 464a) ***A. Blanchetière,*** Act. de la pepsine (trypsine) sur les sol. d'acides monoaminés etc. C. R. **193,** 256, 549 (1931).

ABDERHALDEN (H.W. S. 827, *l.c.* *417b*) fand aus Aminosäuren eine Reversion **nur** durch Organpreßsäfte, nicht mit Verdauungssäften und Hefepreßsaft. LOMBROSO **465)** gibt an, bei längerer Verdauung mit aktivirtem Pankreassaft eine Abnahme der freien Aminosäuren gefunden zu haben, die er mit Vorbehalt als Peptidsynthese deutet. Eine Synthese von Anhydriden, z.B. Leucinimid aus Aminosäuren durch Pulver aus keimenden Bohnen (*Phaseolus Mungo L.*) will BLAGOWESTSCHENSKI **466)** erzielt haben. Die einzige Erfolg versprechende Arbeit ist eine Untersuchung von EULER und SJÖMAN **467)** mit modernen Mitteln. Es gelang mit Darm-erepsin die Synthese von Dipeptiden des Histidins, Alanins und Arginins mit einer Ausbeute bis zu 30 %. Bei höherer Enzymkonz. tritt wieder Spaltung ein. Die Gleichgewichtskonstanten konnten noch nicht genauer berechnet werden.

Über die Reversion der Wirkung von Tryptase habe ich nichts finden können, mit Ausnahme der oben besprochenen Angabe von WASTENEYS und BORSOOK **452)** (V) über Plasteinbildung. Über Reversion durch Enzyme aus der Gruppe der Papainasen liegen einige wenige Angaben vor.

So kann man wenigstens hier das „synthetisirende Enzym" HEDIN's **468)** unterbringen, das in der Milz wirksam ist und durch Säurebehandlung zerstört wird. Es kann durch Extraktion mit NaCl bei schwach alkalischer Reaktion herausgeholt werden und wirkt auch bei alkalischer Reaktion. Es wirkt auf Casein, das mit NaCl und Alkali vorbehandelt und verändert ist, und dann Spaltprodukte aufnimmt. Das Resultat ist eine Zunahme des beim isoelektrischen Punkt fällbaren N. Die ganze Sache ist höchst unklar; sie wird auch nicht klarer durch ähnliche Beobachtungen von WIDMARK **469)** über die Rückbildung von koagulablem Eiweiß in Extrakten aus Leber, Knochenmark, Euter milchender Kühe, sowie eines Enzyms im Blutserum, das auf Casein wirkt. — Ob es sich um enzymatische Synthese handelt, läßt WIDMARK offen.

Eine Plasteinbildung durch Kathepsin des Serums bei Exsudaten an Glutin, nicht Casein will WEISS **470)** gesehen haben. Durch Papain erhielt aus WITTE-Pepton anscheinend dasselbe Plastein wie mit Pepsin HESSE **471)**.

Sehr interessant sind Angaben von VOEGTLIN c.s. **472), 473)** über Reversionsprozesse in Geweben und Tumoren in Abhängigkeit von der Oxydationslage. Auf ihre Bedeutung werden wir erst bei der Autolyse selbst zurückkommen können. Hier also nur die tatsächlichen Angaben.

Sauerstoff hemmt nicht nur die Autolyse, sondern bewirkt geradezu eine Synthese, die symbat verläuft mit der Dehydrirung der für den Abbau nötigen SH-Gruppen. Reichlich SH, hohe Konzentration von Eiweiß-abbauprodukten und neutrale Reaktion verstärken die Synthese. In N_2 findet nur Hydrolyse statt. Normales Gewebe (Muskel) und Tumorgewebe verhalten sich gleich; ein Fibrin-Papain-Modell ähnlich, aber in schwächerem Ausmaß. Bei ph = 6,0—6,5 ist die Synthese geringfügig; oder es erfolgt erst nur Hydrolyse, dann teilweise Synthese. Bei 7,3—7,5 tritt erst Synthese auf, dann aber Proteolyse. Eine specifische Wirkung der Thiole liegt nicht vor, die Vorgänge werden nur vom Redox-Potential beherrscht.

Bestätigung für Papain durch BERSIN **473a)**: Synthese bei gegenwart von Cu-Ascorbinsäure und Disulfid-papain.

---

465) ***U. Lombroso, A. di Frisco,*** Form. di aminoacidi etc. per opera di secr. pancr. etc. Riv. Pat. Sper. **5**, 464 (1930); BPh **58**, 375. — 466) ***A. Blagowestschenski,*** Synth. Wirk. der pflanzl. Proteasen. Bioch. Zs. **168**, 1 (1926). — 467) ***H. v. Euler, B. Sjöman,*** Mikrotitr. Beob. über enzymat. Peptid- und Protamin-Synth. Ark. f. Kemi, 11 A, Nr. 16 (1934). S.A. — 468) ***S. G. Hedin,*** Einwirk. von Milzenz. auf Eiweiß etc. Zs. phys. Chem., **207**, 213, **216**, 203 (1932). — 469) ***G. E. Widmark,*** Einfl. von Blutserum etc. auf Casein etc. Zs. phys. Chem., **207**, 182 (1932). — 470) ***Ch. Weiß, E. J. Czarnetzky,*** Proteol. enz. of . . . pleural exsudates. Arch. of Path., 20, 233 (1935); BPh **90**, 167. — 471) ***E. Hesse,*** Plasteinproblem. Arch. Verdau., **31**, 275 (1923). S.A. — 472) ***C. Voegtlin, M. E. Maver, J. M. Johnson,*** Infl. of oxyg. tens. on the reversal of proteolysis etc. Jl. of Pharm. 48, 241 (1933). S.A. — 473) ***M. E. Maver, J. M. Johnson, C. Voegtlin,*** Infl. of [H+] upon the reversal of proteolysis etc. U.S. Treas. Dep. Publ. Health Serv. Bull. Nr. 164 (1935). S.A. — 473a) ***Th. Bersin, H. Köster,*** Einfl. von Oxyd.- und Red.-Mitteln auf . . Papain. Zs. phys. Chem., **233**, 59 (1935).

Nachtrag I. zu § 462.

Zu der Frage der Entstehung des **Ammoniaks aus Proteinen** (§ 462) haben neuerdings TERROINE und LAURESCO **474)** wichtige Beiträge geliefert. Sie untersuchten reines Pankreassekret, Pankreatin und Protease von *B. mesentericus vulgatus*. Alle drei spalten NH_3 aus allen untersuchten Proteinen ab (Casein, Glutin, Gliadin, WITTE-Pepton). Die NH_3-Abspaltung ist geringfügig, so daß die sehr erhebliche NH_3-Bildung im Darm während der Verdauung praktisch ausschließlich den lebenden Bakterien zuzuschreiben ist (LAURESCO **475)**). Die NH_3-Ausbeute durch die Enzyme verläuft bei den verschiedenen Proteinen gleichförmig; in % des überhaupt durch Totalhydrolyse freizusetzenden NH_3 nach 20 Tagen 10—15 % mit Pankreassaft und 28 % mit Pankreatin. Absolut genommen liefert Gliadin am meisten. Die NH_3-Abgabe verläuft unabhängig von der Hydrolyse der Peptidbindungen. Sie beginnt viel später und setzt sich lange fort. Die Autoren führen die NH_3-Bildung, wie auch hier stets angenommen, auf die Lösung von Säureamid-bindungen (Asparagin, Glutamin) zurück. Nach ihrer Ansicht muß man also entweder die Gegenwart von Amidasen auch im Pankreassekret annehmen; oder aber den spontanen Zerfall der erst allmählich in Freiheit gesetzten Peptide, die Glutamin oder Glutaminsäure enthalten. Dafur stützen sie sich auf eine neue Arbeit von MELVILLE **476)**, der einen derartigen Spontanzerfall unter Freisetzung des gesamten Amid-N als NH_3 in 4—9 Tagen bei 37° fand, während die Glutaminsäure in Pyrrolidoncarbonsäure umgewandelt wird.

Nachtrag II. zu § 477a.

Es sei ferner noch hingewiesen auf die im Text (§ 477a) nicht mehr berücksichtigten sehr interessanten Arbeiten von BOEHM **477—482)** über die Struktur des lebenden Muskels und anderer lebender Gewebe, die mit Hilfe der Strömungsdoppelbrechung und der Röntgenstrahlung untersucht wurden. Ein genaueres Eingehen würde den Rahmen dieses Werkes überschreiten, da es sich ja nicht um Strukturuntersuchungen an Proteinen, sondern der lebenden Faser als solcher handelt; wir müssen uns also mit einer Anführung der Literatur begnügen.

---

474) ***E. F. Terroine, C. Lauresco,*** Libér. de l'ammoniaque au cours des protéol. enzym. Arch. internat. Phys., **42,** 205 (1935). S.A. — 475) ***C. Lauresco,*** Rôle resp. des enz. et des bact. dans la form. de l'ammon. etc. ibid., **42,** 192 (1935). S.A. — 476) ***J. Melville,*** Labile glutamine peptides etc. Biochem. Jl., **29,** 179 (1935). — 477) ***G. Boehm,*** Kurzzeit. Röntgeninterfer. als neue phys. Unters-meth. Zs. Biol., **91,** 203 (1931). S.A. — 478) ***Ders.,*** Röntgendiagramm d. Nerv. Kolloid-Zs., **62,** 22 (1933). S.A. — 479) ***Ders.,*** Form der Linsenalbumoidteilchen. Klin. Monatsbl. Augenheilk., **92,** 347 (1934). S.A. — 480) ***Ders.,*** Form der Micellen des Stromaeiweißes. Bioch. Zs., **282,** 33 (1935). S.A. — 481) ***Ders.,*** Feinstrukt. d. Linsenkapsel. Klin. Monatsbl. Augenheilk., **92,** 452 (1934). S.A. — 482) ***Ders.,*** Muskel. S.A. aus Medizinische Kolloidlehre, Dresden, S. 609.

Abgeschlossen: 30. 6. 36. Ber. Phys. 93, H. 3/4.

B. Nachweis und Bestimmung der Proteasen.

(bearbeitet von Dr. W. Roman).

Es liegt nicht im Plan dieses Werkes in diesem Abschnitt alle zu diesem Zweck ausgearbeiteten Methoden ausführlich zu schildern oder auch nur für die wichtigsten Arbeitsvorschriften zu geben; für diese sei besonders auf den III. Band des H.W. verwiesen. Im folgenden werden nur die Principien der einzelnen Methoden, soweit sie nicht bereits im H.W. an entsprechender Stelle oder im III. Band beschrieben sind, kurz mitgeteilt und die neuere Literatur aufgeführt.

I. Qualitativer Nachweis.

§ 482 (*H.W.* § *480/81*). Verschwinden von Eiweiß. Die neueren Vorschläge hierzu beziehen sich hauptsächlich auf neue Substrate sowie auf deren Herstellungsweisen:

An Stelle von Blutfibrin ist nach Clifford **1)** Muskelfibrin vom Stockfisch brauchbar; da es farblos ist, eignet es sich gut zur Herstellung von Karminfibrin etc. Herstellung von verriebenem Kongorot-fibrin s. Hartridge **2)**. Karminfibrin, das zum Nachweis von Pepsin viel benutzt wird, eignet sich nicht zum Nachweis von Trypsin oder anderen bei höherem ph wirkenden Proteasen **(3)**. In alkalischem Medium ist die Färbung des Substrates mit Spritblau nach Palladin **4)** vorzuziehen. Empfindlicher sind nach Chen **5)** gefärbte Präparate von Ovalbumin. Von diesen eignet sich Preußischblau-eiweiß zum Nachweiß von Pepsin und Nilblau-eiweiß für Trypsin.

Hautpulver, das in seinen Poren Bariumsulfat adsorbirt enthält, kann zum Nachweis der Proteasen nach Sumner und Howell **3)** bei jedem ph benutzt werden, wenn die Enzymlösung wasserklar ist; das bei der Verdauung frei werdende $BaSO_4$ zeigt sich dann durch eine Trübung der Lösung an.

Ausbau der Gelatine-platten-methode (Färbung der Platte nach Verdauung und Fixirung mit saurem Fuchsin oder Hämatoxylin) zur Mikromethode und approximativen quantitativen Bestimmung (vollständige Verdauung: heller Fleck; partielle Verdauung: kleinerer oder größerer Ring) s. Pickford und Dorris **5a)**. Herstellung von Platten für Trypsinbestimmung s. Spehl **6)**.

II. Unterscheidung der Proteasen.

§ 483 (§ *483/84*). Eine Feststellung, ob das vorliegende Präparat Proteinasen oder Peptidasen enthält, läßt sich durch Einwirkung auf die betr. charakteristischen Substrate feststellen.

Gebräuchlichste derartige Substrate nach Waldschmidt-Leitz **7)**:

Casein für Proteinasen,

---

1) ***W. M. Clifford,*** A substitute for blood fibrin in work on dig. Jl. of Physiol., **62**, XIII (1926/7). — 2) ***H. Hartridge,*** Ground congo-red fibrin for test. vel. of enz. Jl. of Phys., **81**, 11 P. (Proc. S. 11) (1934). — 3) ***J. B. Sumner, St. F. Howell,*** Qualitative test for enz. of the trypsin a. papain types. Jl. of Biol. Chem., **109**, 429 (1935). S.A. — 4) ***A. Palladin,*** Eine einfache quantit. Trypsinbest. Arch. ges. Phys. (Pflüger), **184**, 237 (1925). — 5) ***Ch.-Chi Chen,*** Dyed denatured egg albumin for qualit. tests of pepsin a. trypsin. Chin. Jl. of Phys., **5**, 159 (1931); BPh **62**, 635. — 5a) ***G. E. Pickford, F. Dorris,*** Micro-meth. for the detect. of proteases a. amylases; BPh **84**, 466. — 6) ***P. Spehl, Ch. Rahier,*** Milieux pour l'étude des ferm. pancr. C. R. Soc. Biol., **95**, 732 (1926). — 7) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Strukt. der Prot. auf Grund der enzymat. Analyse. Chem. Weekblad, **27**, 266 (1930). S.A.

Chloracetyl-tyrosin für die Carboxy-polypeptidase,
Leucyl-glycyl-glycin für die Amino-polypeptidase,
d, l-Leucyl-glycin für Dipeptidase (s. a. l. c. 27).

Die für bestimmte Methoden vorgeschlagenen Substrate zur Bestimmung eines oder mehrerer bestimmter Fermente sind bei den einzelnen Methoden genannt. Zur Benutzung beliebiger Methoden, aber für bestimmte Fermente liegen folgende Vorschläge vor:

Für Pepsin: Trockenes Alkaliprotein COLELLA 8); Fibrinkörnchen bestimmter Größe MOZOLOWSKI und HILAROVICZ 9); Edestin und Gelatine NORTHROP (l. c. 85).

Für Trypsin: Gelatine-Gummi arabicum-Emulsion HOLLANDER und MARCUS 10); Elastin SCHNEIDER und HÁJEK 11); Gelatine WILLSTÄTTER und GRASSMANN 12).

Für Papain: Gelatine WILLSTÄTTER und GRASSMANN 14) (s. auch H.W. Bd. III, S. 1015); Fibrin WILLSTÄTTER c.s. 15).

Für Protaminase: Saures Proton, Herstellung WEIL 13).

Für Carboxy-polypeptidase: Sarcosyl-l-tyrosin, ABDERHALDEN und SCHWAB 15a).

Für Dipeptidase: Glycyl-glycin EULER und JOSEPHSON 16); Glycyl-tryptophan PFEIFFER c.s. (l. c. 78).

Gelatinase kann (mit Gelatine als Substrat) nach SMITH (l. c. 66) einwandfrei nur durch die Viscositätsänderung der Gelatine (§ 495) bestimmt werden.

III. Quantitative Bestimmung der Proteasen.

Allgemeines.

§ 485. Wie im H.W. S. 847 bereits gesagt wurde, kann die Menge vorhandenen Fermentes nicht bestimmt werden, sondern nur besten Falls die Zahl der vorhandenen Einheiten der Wirksamkeit in einem bestimmten Präparat, da ja noch keineswegs festzustellen ist, ob es sich im einzelnen Fall um eine große Menge (oder Konzentration) gering oder langsam wirkenden (gehemmten) Fermentes oder um eine kleine Menge stark wirkenden Fermentes handelt, so lange man nicht weiß, wieviel eine „Ferment-einheit wiegt"; vgl. a. POLLAND und BLOOMFIELD 17).

Vergleich verschiedener Methoden. Vergleich der nephelometrischen (Mikro-) Methode, also der Bestimmung des ungespaltenen Restes, mit der titrimetrischen (Makro-) Methode, also der Bestimmung der Menge der Spaltprodukte RONA c.s. 18). Das Entstehen der Verdauungsprodukte (gemessen mit der alkoholischen Titration der Carboxylgruppen nach WILLSTÄTTER (s. § 492) geht dem Verschwinden des Substrates (bestimmt nach GROSS, FULD-

---

8) ***C. Colella,*** Il met. con le alcaliproteine per la ricerca e il dosamento della pepsina. Biochim. e Ter. sper., **20**, 311 (1933); BPh **75**, 349. — 9) ***W. Mozolowski, H. Hilarowicz,*** Über das Wesen des sog. Serumantipepsins. Bioch. Zs., **164**, 295 (1925). — 10) ***E. Hollander, I. M. Marcus,*** Quant. determ. of pancreat. enzymes. Arch. of intern. med., **36**, Nr. 4, S. 585 (1925); BPh **34**, 727. — 11) ***J. Schneider jun., A. Hájek,*** Vorvers. f. eine neue Meth. zur Bewert. der Enzymbeizen nach deren Einfl. auf Elastin. Bioch. Zs., **195**, 403 (1928). — 12) ***R. Willstätter, W. Graßmann,*** Über die Proteasen der Hefe. Zs. phys. Chem., **153**, 250 (1926). — 13) ***L. Weil,*** The preparat. of enzym. pure proteinase a. the quant. determ. of influence of protaminase. Jl. of Biol. Chem., **105**, 291 (1934). — 14) ***R. Willstätter, W. Graßmann,*** Über die Aktiv. d. Papains durch Blausäure. Zs. phys. Chem., **138**, 184 (1924). — 15) ***R. Willstätter, W. Graßmann, O. Ambros,*** Über die Einheitl. einiger Pflanzenproteasen. Zs. phys. Chem., **152**, 164 (1926). — 15a) ***E. Abderhalden, E. Schwab,*** Die aus der Leber darstellbaren Ferm. etc. Ferment-Forsch., **13**, 544 (547 Fußnote 1) (1933). S.A. — 16) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Enzymat. Spalt. von Dipeptiden. Ber. Chem. Ges., **59**, 226 (1926). — 17) ***W. Scott Polland, A. L. Bloomfield,*** A quantit. meth. for the estim. of pepsin. Jl. of clin. Invest., **7**, 45 (1929). — 18) ***P. Rona, H. Kleinmann, E. Dressler,*** Wirkg. v. Spaltprod. auf fermentat. Proteolyse. Bioch. Zs., **228**, 6 (1930).

Levisohn, Mett und Fermi, s. § 488 und H.W. S. 848 ff.) nach Adowa und Smorodinzew **19)** parallel. Die Viscositätsänderung beim peptischen Abbau von Casein (§ 495) steht zu der Anzahl der nach Linderstrøm-Lang titrirbaren Aminogruppen (§ 492) nach Holter **20)** in einem bestimmten, für das angewandte Enzympräparat charakteristischen Verhältnis.

§ 486. Klinische Methoden; vgl. hierzu auch § 491.

Bestimmung von Pepsin: s. H.W. Bd. III, S. 1509, sowie außerdem Hirsch-Mamroth **21)** (§ 491), Galli **22)** (§ 487), Polland und Bloomfield **17)** (§ 487), Greenberg (l. c. 32, § 492), Ochiai (l. c. 101, § 495), Rona und Kleinmann (l. c. 117, § 495).

Bestimmung von Trypsin: s. H.W. Bd. III, S. 1539, sowie außerdem im Harn (Anreicherung durch Ausfällung des Trypsins nach Adsorption an Casein) bei Buadze **23)**. Klinische Mikro-bestimmung von Trypsin (Schwellenwertsmethode unter Verdauung sehr verdünnter (0,1 ‰) Casein-lösung (s. a. § 487), Baumann **24)**, von Bluttryptasen Ssokolnikow **26)**; Bestimmung der Serumtryptasen Utkin-Ljubowzow **25)**, der antitryptischen Wirkung des Blutserums Flexner c.s. (l. c. 88, § 495).

Bestimmung von Lab: s. H.W. Bd. III, S. 1529.

Bestimmung von Peptidasen: s. H.W. Bd. III, S. 1548, 1550, sowie außerdem im Harn bei Buadze **27)**.

1) Methoden der Bestimmung der verminderten Substratmenge.

§ 487 (§ *486/87*). Erneute Ablehnung der Mett'schen Methode Frisco **28)**.

Ausbau der Fermi'schen Probe der Gelatineverflüssigung (s. H.W. Bd. III, S. 951) zu einer Schwellenwertsmethode zur Bestimmung des Pepsingehaltes im Magen Galli **22)**.

Gravimetrische Methoden. Die Verdauung von Fibrinpulver mit bekanntem H_2O-Gehalt wird von Willstätter c.s. **15)** zur Papainbestimmung angewandt; das unverdaut gebliebene Substrat wird nach Trocknung zurückgewogen (vgl. a. H.W. Bd. III, S. 956). Auf gleiche Weise kann nach Colella (l. c. 8) mit trockenem Alkaliprotein als Substrat gearbeitet werden.

Bei Anwendung von flüssigem Substrat kann nach Ablauf des Fermentversuches das überschüssige Substrat coagulirt und die entstandene Trübung oder die geflockte Menge bestimmt werden: Erzeugung einer Trübung in Eiereiweiß-lösung mit Trichloressigsäure Slive **29)**, in Casein-lösung mit alkohol. Essigsäure oder Sulfosalicylsäure Baumann (l. c. 24).

Die Trübung kann visuell beobachtet werden; exakter ist es jedoch, sie auf nephelometrischem Wege zu bestimmen; Näheres hierzu s. bei den physikalisch-chemischen Methoden § 495.

Bestimmung des unverdauten Eiweißes (Edestin nach Verdauung mit Pepsin bei ph = 2) durch Fällung. Mit 15 %iger Trichloressigsäure im graduirten Zentrifugenrohr Polland und Bloomfield (l. c. 17). Auf ähnlichem Princip beruht die Pepsinbestimmung nach Boas, die von Hirsch-Mamroth (l. c. 21) modifizirt und neu beschrieben wird.

---

19) ***A. N. Adowa, I. A. Smorodinzew,*** Z. Kenntnis d. Proteasennatur III. Zs. phys. Chem., **183**, 133 (1929). — 20) ***H. Holter,*** Z. Kenntnis d. Pepsins. Zs. phys. Chem., **196**, 1 (1931). — 21) ***P. Hirsch-Mamroth,*** Die pepsinhemmende Eigensch. d. Blutserums, zugleich eine neue Best.-Meth. Arch. Verdau., **35**, Heft 3/4, S. 174 (1925); BPh **34**, 256. — 22) ***F. Galli,*** Il comportamento della pepsina sec. i vari pasti di prova. Fol. clin. chim. et microsc. Bologna **3**, 191 (1928); BPh **49**, 765. — 23) ***S. Buadze,*** Einfaches Verf. z. quantit. Best. d. trypt. Leistung des . . . Harnes. Fermentforsch., **14**, 56 (1933/5). — 24) ***J. Baumann,*** Trypsinvergift. bei akuter Pankreasnekrose. Zs. exp. Med., **91**, 120 (1933). — 25) ***L.*** und ***X. Utkin-Ljubowzow,*** Neue Meth. z. Best. d. Serumtryptasen. Bioch. Zs., **169**, 100 (1926). — 26) ***O. Ssokolnikow,*** Die Blut-tryptase und eine neue Mikrometh. z. ihrer Best. Bioch. Zs., **213**, 414 (1929). — 27) ***S. Buadze,*** Vergl. meth. Stud. über die quant. Best. d. Peptidasenwirkg. im Harn. Fermentforsch. **14**, 143 (1933/5). — 28) ***S. di Frisco,*** Di solvim. dell'ovalbumina coagulata e dig. della fibrina da paste dell secreto pancr. puro con e senca $CaCl_2$. Boll. Soc. ital. Biol. sper., **3**, 465 (1928); BPh **49**, 268. — 29) ***A. Slive,*** Stud. on antipepsin with a new quant. meth. for its determ. Jl. of Lab. Clin., **18**, 801 (1932/3).

§ 488. Anwendung der Methode von GROSS und FULD (s. H.W. S. 851, 852) zur Bestimmung der antitryptischen Wirkung des Blutserums GENTILE 30); Empfehlung der Methode für klinische Zwecke MORACCHINI 31), nach GREENBERG 32) ist sie jedoch so unzuverlässig, daß er von einer Aufnahme derselben als Vorschrift für die Pepsinbestimmung in das Arzneibuch abrät. ph-Bestimmung bei der Pepsinbestimmung nach dieser Methode SMORODINZEW und ADOWA 33). Zur Trypsinbestimmung nach GROSS muß die Caseinlösung nach 34) unter Zusatz von 3—4 cm^3 0,1 n HCl hergestellt werden, um die Bestimmung beim opt. ph durchführen zu können. Für die Pepsinbestimmung sind Pufferzusätze zur Caseinlösung nach SMORODINZEW und ADOWA 35) ohne Bedeutung. — Ablehnende Kritik der Methode von EGE (H.W. S. 853, Bd. III, S. 962), UTKIN (l. c. 104).

§ 489 (§ *489/90*). Die Methoden, die auf dem Princip der Messung der Aufhellung eines getrübten oder der Trübung eines klaren Substrates beruhen, bedienen sich heute durchweg des Nephelometers und sind dementsprechend bei den physikalisch-chemischen Methoden § 495 behandelt. Soweit noch Angaben zur visuellen Beobachtung vorliegen, sind sie bereits § 487 erwähnt.

2) Methoden der Zeitmessung.

§ 490 (§ *491*). Wie bereits im H.W. S. 855 ausgeführt wurde, werden die Methoden der eigentlichen Zeitmessung, bei denen die Zeit bis zum Ende einer Reaktion festgestellt wird, kaum angewandt.

Nur für die Labbestimmung ist es angebracht, die Gerinnungszeit zu messen, und es ist dementsprechend eine neuere Methode zu diesem Zweck von KUNITZ 36) ausgearbeitet worden; vgl. auch REDONNET und RODRÍGUEZ 37). Da der Umschlagspunkt jedoch nicht immer einwandfrei festzustellen ist, ist auch hier die Messung der Viscositätsänderung im gesamten Verlauf des Fermentversuches nach LÜERS und DIEM (l. c. 82) vorzuziehen.

Jedoch wird von der Zeitmessung in anderer Weise vielfach Gebrauch gemacht, indem der Umsatz nach einer bestimmten Zeit anstatt nach vollständigem Ablauf der Reaktion festgestellt wird. Diese Art der Zeitmessung kann bei fast allen Methoden der Bestimmung der verminderten Substratmenge sowohl als auch bei denen der Messung der Verdauungsprodukte angewandt werden, und es werden auf diese Weise im allgemeinen auch zuverlässigere Ergebnisse erzielt, da die Aktivität eines Fermentes besonders in den Anfangsstadien seiner Wirkung meist der für die Wirkung erforderlichen Zeit proportional ist; vgl. z. B. POLLAND und BLOOMFIELD (l. c. 17). Auch die Einheit der Wirkung eines Fermentes wird vielfach auf diese Weise bestimmt; vgl. z. B. WALDSCHMIDT-LEITZ 38).

3) Messung der Verdauungsprodukte.

§ 491 (§ *492*). Bei den alten Methoden wurde gewissermaßen die Summe der Verdauungsprodukte gemessen, entweder direkt, wie nach GRÜNHAGEN (H.W. S. 855) durch Messung der Menge des gelösten Fibrins, oder indirekt, wie nach GRÜTZNER durch Bestimmung von in Lösung gehendem Farbstoff.

---

30) ***F. Gentile,*** Il potere antitript. del siero di sangue e sua determ. Ann. clin. Med. e med. sperim., **17**, Heft 2, S. 149 (1927); BPh **45**, 269. — 31) ***R. Moracchini, A. Allodi,*** Il dos. dei ferm. pancr. nel succo duodenale. Arch. Sci. med. **52**, 561 (1928); BPh **49**, 767. — 32) ***H. L. Greenberg,*** The assay of pepsin. Jl. Amer. Pharm. Soc., **20**, 1032 (1931). — 33) ***J. A. Smorodinzew, A. N. Adowa,*** Les tampons dans l'étude des protéases. Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 1060 (1925). — 34) ***J. A. Smorodinzew, A. N. Adowa,*** Das Opt. d. Wasserstoffionenkonz. bei d. Trypsinbest. nach der Meth. v. Gross. Zs. phys. Chem., **160**, 189 (1926). — 35) ***Dies.,*** Influence des tamp. sur la dig. de la caséine par la pepsine. Bull. Soc. Chim. Biol., **7**, 1068, 1154 (1925). — 36) ***M. Kunitz,*** Meth. for determ. the rennet activ. of chymo-trypsin. Jl. of gen. Phys., **18**, 459 (1935). S.A. — 37) ***T. Alday Redonnet, A. Rodríguez-Rodríguez,*** Wertbest. d. Lab. ferm. Bol. Soc. españ. Biol., **13**, 11 (1927); BPh **48**, 694. — 38) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Deutsch,*** Über die proteol. Enz. d. Milz. Zs. phys. Chem., **167**, 285 (1927).

Diese Art der Bestimmung nimmt heute an Bedeutung immer mehr ab und wird für exakte Untersuchungen überhaupt nicht mehr angewandt. Es liegen daher nur wenige neuere Verbesserungs-vorschläge vor, die hauptsächlich für die klinische Anwendung (s. auch § 486) in Frage kommen: Neue Standardlösung zur kolorimetrischen Bestimmung von Pepsin **(39)**, von Trypsin **(40)**. Ähnliche Arbeitsweise mit Kongorot-casein **(41)**.

Hierzu gehört auch die vielfach noch jetzt angewandte Bestimmung des in Lösung gegangenen Gesamt-Stickstoffs nach KJELDAHL bei Benutzung eines unlöslichen Substrats, wie z. B. Elastin (SCHNEIDER und HÁJEK, l. c. 11); hierbei muß jedoch die aus dem Substrat ohne Enzym-einwirkung auslaugbare N-Menge, sowie der N-Gehalt der Enzymlösung bekannt sein oder vorher bestimmt werden, um einwandfreie Resultate zu erhalten.

a) Bestimmung der Aminosäuren.

§ 492 (§ *493*). Am wichtigsten für die Erforschung der proteolytischen Wirksamkeit ist heute die Messung der Spaltung von Säureamid-bindungen (WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 7). Hierbei werden Aminogruppen und Carboxylgruppen (bei normaler Proteasenwirkung in äquivalenter Menge, s. § 478a) frei, die nach verschiedenen, z. T. sehr exacten Methoden bestimmt werden können. Diese titrimetrischen Methoden sind den physikalisch-chemischen im allgemeinen wegen ihrer vielfältigen Andwendbarkeit nach WALDSCHMIDT-LEITZ **42)** vorzuziehen, besonders auch, da sie einwandfreie Schlüsse über den Gang der Spaltung erlauben, insofern als keine weiteren Eigenschaften der (gegebenenfalls unbekannten) Spaltprodukte bekannt zu sein brauchen.

Die Aminogruppen stellen einen Bestandteil des gesamten Protein-N dar, dessen andere Bestandteile vielfach auch bei Fermentversuchen bestimmt werden müssen. Das Gesamt-N wird wohl stets durch Mikro-KJELDAHL bestimmt. Die **Aufteilung des Protein-N** kann in folgender Weise vorgenommen werden: Das Amino-N wird nach einer der unten beschriebenen Methoden (besonders VAN SLYKE) direkt bestimmt und ergibt die Summe der freien und gebundenen NH_2-Gruppen. Außerdem kann eine Aufteilung durch Fällung erfolgen, wobei durch verschiedene Fällungsmittel die unverdauten Proteine sowie mehr oder minder große Spaltstücke ausgefällt und abfiltrirt werden, worauf sowohl der „Rest-N" der Lösung als auch der N-Gehalt der ausgefällten Substrate nach KJELDAHL bestimmt werden können. Die freien NH_2-Gruppen werden durch eine erneute NH_2-Bestimmung (am besten nach FOLIN) in der Lösung erhalten. Als Fällungsmittel dienen verschiedene Enteiweißungsmittel, wie besonders Phosphorsäure und Trichloressigsäure, weitere Substanzen s. H.W. Bd. III, S. 963. So konnte GRASSMANN **43)** durch Phosphorwolframsäure eine „Basenfraktion" und eine „Mono-aminosäurefraktion" aus Kyrinen abtrennen. Auch die früher viel angewandte Trennung in Protein, Metaprotein, Proteosen, Peptone und Subpeptone erfolgt auf diese Weise, wobei z. B. zur Fällung von Protein nach WASTENEYS und BORSOOK **43a)** Trichloressigsäure, für Proteosen Na_2SO_4, für Pepton Gerbsäure benutzt werden. — Ohne Interesse ist hier die weitere Aufteilung des Stickstoffs (Purin-N, Harnstoff-N usw.; vgl. auch CHRISTOMANOS **43b)**.

Rest-N-Bestimmung nach Enteiweißen mit Trichloressigsäure und Vergleich der Ergebnisse mit der Formoltitration und der viscosimetrischen Bestimmung nach Pepsinverdauung von Edestin, Casein und Gelatine s. NORTHROP (l. c. 85). Bestimmung des löslichen N nach tryptischer Verdauung von Elastin SCHNEIDER und HÁJEK (l. c. 11).

39) ***J. A. Smorodinzew, A. N. Adowa,*** Bereitung v. Stand. z. kolorimetr. Best. d. Pepsins. Zs. phys. Chem. **149**, 173 (1925). — 40) ***Dies.***, Bereitung v. Stand. z. kolorimetr. Best. d. Trypsins. Bioch. Zs., **153**, 14 (1924). — 41) ***M. Kawahara, O. Peczenik,*** Z. Meth. d. quant. Pepsinbest. mittels Kongorot. Wiener Med. Ws., **76**, 129 (1926); BPh **35**, 729. — 42) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Simons,*** Über die Wirkungsw. d. Pepsins. Zs phys. Chem., **156**, 114 (1926). — 43) ***W. Graßmann c.s.,*** Zur Kenntnis d. Kyrine. Bioch. Zs. **269**, 211 (1934), **284**, 177 (1936). — 43a) ***H. Wasteneys, H. Borsook,*** A meth. for the fract. anal. of incompl. prot. hydrolysates. Jl. of Biol. Chem., **62**, 1 (1924/5). — 43b) ***A. A. Christomanos,*** Z. Fraktionirung d. Rest-N etc. Bioch. Zs., **221**, 473 (1930). S.A.

Die Bestimmung der Aminogruppen erfolgt vielfach durch das bekannte gasanalytische Verfahren von VAN SLYKE (s. H.W.S. 857 und Bd. III, S. 983).

Modifikation des VAN SLYKE'schen Apparates zur Bestimmung der primären aliphatischen Aminogruppen zur größeren Feinheit der Makro-bestimmung und Ausführung derselben in Mikroapparaturen s. KUPELWIESER **44)**. Das als Fällungsreagens oder auf andere Weise in die Fermentlösung gelangende $(NH_4)_2SO_4$, sowie auch etwa vorhandene Ammonsalze müssen vorher durch $Ca(OH)_2$ zersetzt werden, da deren N sonst mit bestimmt wird. Neuere Vorschriften hierzu s. GRASSMANN **43)**, WEBER und GESENIUS (l. c. 55). In stark saurer Lösung werden auch Amidgruppen miterfaßt (PLIMMER **45)**). Bei Analyse von Spaltungsgemischen muß nach SØRENSEN c.s. **46)** möglichst sorgfältig auf gleichmäßige Behandlung (Schütteln etc.) der einzelnen Proben geachtet werden, um vergleichbare Resultate zu erhalten. Aus Glutamin-peptiden wird das Amid-N nach CHIBNALL und WESTALL (l. c. 81a) auch bei höherem ph mit erfaßt.

Als bequem und zuverlässig zur Aminogruppen-bestimmung hat sich auch die kolorimetrische Methode von FOLIN (H.W. S. 858, sowie Bd. III, S. 989) erwiesen. Die auf diesem Wege erhaltenen Werte stimmen mit den gasanalytischen Ergebnissen nach VAN SLYKE gut überein, s. STEUDEL und ELLINGHAUS **47)**.

Eine neue, sehr zuverlässige Methode ist die **acidimetrische Titration** der basischen Gruppen **in acetonhaltiger Lösung** von LINDERSTRØM-LANG **48)—50)**. Die basischen Aminogruppen der meisten Aminosäuren lassen sich hiernach mit alkoholischer HCl mit Naphtol-Rot als Indikator direkt titriren. Die Methode liefert nach HOLTER (l. c. 20) auch bei trüben Medien sehr genaue Werte. Ausbau zu einer Mikromethode, mit der noch 0,056 γ Amino-N scharf erfaßt werden können, LINDERSTRØM-LANG und HOLTER **51), 52)**; vgl. auch SØRENSEN c.s. **46)**, sowie VON EULER und SJÖMAN **46a)**, OELKERS **55a)**.

Bestimmung der Carboxylgruppe. Zu diesem Zweck wird meist die alkalimetrische Titration in alkoholischer Lösung nach WILLSTÄTTER (s. H.W. S. 858, sowie auch Bd. III, S. 977) angewandt. Nach diesem Verfahren lassen sich alle Aminosäuren einwandfrei titriren (WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **57)**). Auch der Spontanzerfall der Glutaminpeptide stört bei der Bestimmung nach dieser Methode (in 90%igem Aceton) nach MELVILLE (l. c. 476, § 481) nicht.

Bei Benutzung dieser Methode zur Titration in phosphathaltigen Lösungen ist nach WALDSCHMIDT-LEITZ und SCHÄFFNER **53)** die Titration in 85 %iger CH_3OH-Lösung einer solchen in 90%igem C_2H_5OH vorzuziehen. Dies gilt besonders bei Anwendung der Methode zur Peptidasenbestimmung **(54)**. Bei peptischer Casein-verdauung ist nach WEBER und GESENIUS **55)** die Titration in wässeriger Lösung vorzuziehen, da in der sauren alkoholischen

---

44) ***E. Kupelwieser, K. Singer,*** Vers. über d. Nachweisbark. immunisator. bed. Fermentproz. VII. Bioch. Zs., **178**, 324 (1926). — 45) ***R. A. Plimmer,*** The action of nitrous acid upon amides a. other „amino"-compounds. Jl. chem. Soc. London, **127**, 2651 (1925). — 46) ***S. P. L. Sørensen, L. Katschioni-Walther,*** Über d. Pepsinspalt. Zs. phys. Chem., **174**, 251 (256) (1928). — 46a) ***H. v. Euler, B. Sjöman,*** Mikrotitr. Beob. über enzymat. Peptid- und Protamin-Synth. Ark. f. Kemi, **11** A, Nr. 16 (1934). S.A. — 47) ***H. Steudel, J. Ellinghaus, A. Gottschalk,*** Unters. z. Charakter. d. Pepsinwirkg. Zs. phys. Chem., **154**, 21 (1926); ***J. Ellinghaus,*** Z. Unters. trypt. Verdauungsgem. etc. Zs. phys. Chem., **145**, 40 (1925). — 48) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Volumetr. determ. of amino-nitrogen. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **17**, Nr. 4 (1927). S.A.; Zs. phys. Chem., **173**, 32 (1928). — 49) ***K. Linderstrøm-Lang,*** On pept. hydrol. C. R. Trav. Lab. Carlsb., **17**, Nr. 7 (1928). S.A. — 50) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Bemerk. über d. Indikatorfrage. Zs. phys. Chem., **174**, 275 (1928). — 51) ***K. Linderstrøm-Lang, H. Holter,*** Best. kleiner enzymat. Spalt. Zs. phys. Chem., **201**, 9 (1931); C. R. Trav. Lab. Carlsb., **19**, Nr. 4, S. 1 (1931). — 52) ***H. Holter, K. Linderstrøm-Lang,*** Proteinasen v. Drosera rotundifolia. Zs. phys. Chem., **214**, 223 (239) (1933). — 53) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner,*** Z. Kenntnis d. Darmerepsins. Zs. phys. Chem., **151**, 31 (1926). — 54) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck,*** Trypt. u. erept. Wirkg. d. Pancreasdrüse. Zs. phys. Chem., **147**, 286, (293) (1925). — 55) ***H. H. Weber, H. Gesenius,*** Proteasen u. proteolyt. Hemmungsk. Bioch. Zs., **187**, 410 (433, 434) (1927). — 55a) ***H. A. Oelkers,*** Erepsin. Bioch. Zs., **226**, 185 (1930).

Lösung Casein leicht irreversibel ausflockt; vgl. jedoch WILLSTÄTTER c.s. **56**). Modifikation und Anwendung zur Bestimmung von Enterokinase, sowie Malz-Proteinase LINDERSTRØM-LANG c.s. **58**), **59**), zur Trypsinbestimmung mit Gelatine WILLSTÄTTER c.s. **56**), zur Pepsinbestimmung mit Gelatine WILLSTÄTTER c.s. **56**), zur Pepsinbestimmung mit Casein LINDERSTRØM-LANG **49**), mit Gelatine, Casein und Gliadin SØRENSEN c.s. **46**).

Für die WILLSTÄTTER'sche Methode geben GRASSMANN und HEYDE **60**) eine Mikroausführung an, deren Zuverlässigkeit von MANSOUR-BEK **61**) bestätigt wird. Mikromodifikation s. auch DIONESOV **62**).

Die freiwerdenden Aminosäuren lassen sich nach JUKES **63**) direkt mit Alkali und Phenolphtalein als Indikator titriren, wenn bei tryptischer Verdauung ein ph = 8,5, also weit genug vom isoelektrischen Punkt entfernt, eingestellt wird; vgl. auch LEVENE c.s. **64**), sowie H.W. Bd. III, S. 982. Die Messungen gehen der Formoltitration parallel (**68**).

Von Bedeutung ist auch immer noch die ältere Methode der **Formoltitration** nach SØRENSEN (H.W. S. 857, sowie Bd. III, S. 971); hierzu neuerdings NORTHROP (l.c. 85), LINDERSTRØM-LANG (l. c. 49), SØRENSEN (l. c. 46). Bei dieser Titration werden Arginin und Prolin nicht oder nur unvollständig mitbestimmt, während Tyrosin zu hohe Werte gibt, da auch dessen phenolische OH-Gruppe teilweise mittitrirt wird (GRASSMANN); vgl. auch H.W. Bd. III, S. 972.

Die Empfindlichkeit der Methode wird durch eine Modifikation von KUPELWIESER **64a**) derart erhöht, daß noch 0,06 mg (60 γ) Amino-N auf diese Weise bestimmt werden können. Die Formoltitration wird von GREENBERG (l. c. 32) zu einer einfachen und sicheren Pepsinbestimmungs-methode für das Arzneibuch ausgebaut. Anwendung bei der Dipeptidasenbestimmung v. EULER und JOSEPHSON (l. c. 16).

b) Methoden zur Bestimmung von Fermenten durch Bestimmung einzelner bekannter Spaltprodukte.

§ 493. Kolorimetrische Bestimmung der Tyrosin-, Tryptophan-, und Cystein-gruppen mit Phenol-reagens und Tyrosinlösung als Standard nach Verdauung von Hämoglobin mit Pepsin ANSON und MIRSKY **65**). Diese Methode gibt nach SMITH **66**) für Pepsin Werte, die mit denen nach der Methode von GATES (§ 495) erhaltenen übereinstimmen, erlaubt aber nicht die Bestimmung der Gelatinase. — Kolorimetrische Bestimmung des Tyrosins nach Verdauung von (denaturirtem) Hämoglobin mit Trypsin ANSON und MIRSKY **67**). — Dipeptidase. Kolorimetrische Bestimmung des Glykokolls nach Spaltung von Glycyl-glycin PERSSON **68**), des Tryptophans nach Spaltung von Glycyl-tryptophan PFEIFFER c.s. (l. c. 78), sowie § 494.

---

56) ***R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, S. Duñaiturria, G. Künstner,*** Z. Kenntnis d. Trypsins. Zs. phys. Chem., **161**, 191 (1926); ***R. Willstätter, H. Persiel,*** Trypsinbest. Zs. phys. Chem., **142**, 245 (1925). — 57) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, W. Graßmann,*** Über die Strukt. d. Clupeins. Zs. phys. Chem., **156**, 68 (88) (1926). — 58) ***K. Linderstrøm-Lang, M. Sato,*** On the determ. a. separ. of the proteol. enz. of green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsb., **17**, Nr. 17 (1929). S.A.; Zs. phys. Chem., **201**, 9 (1931). S.A. — 59) ***K. Linderstrøm-Lang, E. M. Steenberg,*** Determ. of trypsin a. enterokinase. C. R. Trav. Lab. Carlsb., **17**, Nr. 16 (1929). S.A. — 60) ***W. Graßmann, W. Heyde,*** Alkalimetr. Mikrobest. d. Aminos. u. Peptide. Zs. phys. Chem., **183**, 32 (1929). — 61) ***J. J. Mansour-Bek,*** Die proteol. Enz. v. Maja squinado Latr. Zs. vergl. Physiol., **17**, 153 (170) (1932). S.A. — 62) ***S. Dionesov,*** Mikromod. d. Caseinmeth. z. Best. d. Pepsins im Magensaft. Russk. Fiziol. Ž., **13**, 547 (1930); BPh **60**, 791. — 63) ***Th. Jukes,*** Measur. of trypt. dig. by direct titration. Jl. of Biol. Chem., **109**, XLVII (1935). — 64) ***P. A. Levene, H. S. Simms, M. H. Pfaltz,*** The rel. of the chem. struct. to the rel. of hydrol. etc. Jl. of Biol. Chem., **61**, 445 (1924). — 64a) ***E. Kupelwieser,*** Vers. über d. Nachweisbark. immunisator. bed. Fermentproz. V. Bioch. Zs., **178**, 298 (1926). — 65) ***M. L. Anson, A. E. Mirsky,*** The estim. of pepsin with hemoglobin. Jl. of gen. Phys., **16**, 59 (1932). S.A. — 66) ***E. R. B. Smith,*** Gelatinase a. the Gates-Gilman-Cowgill-meth. of pepsin estim. Jl. of gen. Phys., **17**, 35 (1933/4). — 67) ***M. L. Anson, A. E. Mirsky,*** Estim. of trypsin with hemoglobin. Jl. of gen. Phys., **17**, 151, 159, 393 (1933/4). — 68) ***W. M. Persson,*** Kolorimetr. Reak. auf d. System Glycyl-glycin — Glykokoll. Arch. internat. Pharmacodyn., **49**, 204 (1934); BPh **85**, 166.

c) Quantitative Bestimmung einzelner Spaltprodukte.

§ 494. Die Abtrennung einzelner Aminosäuren aus dem Gemisch der Abbauprodukte kann durch Adsorptionsanalyse nach WALDSCHMIDT-LEITZ und SCHÄFFNER **69)** vorgenommen werden.

Über die Bestimmung einzelner Aminosäuren s. auch bei den „einfachsten Bausteinen des Proteinmoleküls" § 463 bis § 468, S. 629 u. ff. Weiterhin sind noch folgende neuere Methoden angegeben für:

Glycin, Kolorimetrische Bestimmung mit Ortho-phtaldialdehyd KLEIN und LINSER **70)**, sowie ABDERHALDEN und NEUMANN **71)**; durch kolorimetrische Messung der Farbänderung von zugesetztem Phenolphthalein infolge der Verschiebung des ph durch das freiwerdende Glycin nach der alkalischen Seite PERSSON (l.c. 68).

Alanin, titrimetrische Mikro-bestimmung nach Überführung in Milchsäure s. FÜRTH c.s. **72)**.

Cystin, kolorimetrische Bestimmung mit Phosphorwolframsäure FOLIN und MARENZI **73)**; vgl. auch JONES und GERSDORFF **74)**.

Lysin, Fällung als Reineckat GRASSMAN (l.c. 97, S. 631).

Arginin, Bestimmung mit Arginase s. S. 567, sowie HUNTER und DAUPHINEE **75)**, als Flavianat LIEBEN und LIEBER **76)**, kolorimetrisch mit Acetylbenzoyl LANG **77)**, LIEBEN und LIEBER **76)**.

Tryptophan, kolorimetrische Bestimmung mit Essigsäure und Chlorkalklösung nach Spaltung von Glycyl-tryptophan zur Bestimmung von Dipeptidase s. PFEIFFER c.s. **78)**. Kolorimetrische Bestimmung von Tryptophan mit Phenolreagens und Tyrosin mit Millon-reagens nebeneinander nach Ausfällung des Tryptophans mit Hg-Salzen s. FOLIN c.s. **79)**; vgl. auch McFARLANE und FULMER **80)**, FÜRTH und FISCHER (l.c. 109, S. 632), sowie für Tyrosin ANSON und MIRSKY (l. c. 67, § 493)

l-Prolin, neue wichtige Methode der Bestimmung durch Fällung mit dem Ammonsalz der Rhodanilinsäure BERGMANN **81)**, Fällung als Reineckat KAPFHAMMER c.s. (l.c. 115, § 467).

Histidin, Fällung als Reineckat KAPFHAMMER c.s. (l. c. 119a, § 467).

Glutamin. Bestimmung neben Asparagin nach VAN SLYKE auf Grund der geringen Beständigkeit seiner Amidgruppen CHIBNALL und WESTALL **81a)**.

4) Physikalisch-chemische Methoden.

§ 495. Wie wir schon verschiedentlich betonten, sind die physikalisch-chemischen Methoden im Laufe der letzten Jahre sehr erheblich erweitert worden und haben auch wesentlich zu den Fortschritten unserer Erkenntnis über die Wirkungsweise der Proteasen (insbesondere den „ersten Angriff", s. § 478 u. 480) beigetragen. Die Anwendung und Handhabung der verschiedenen neuen Apparaturen kann hier natürlich, wie bereits oben erwähnt, nicht in extenso erklärt werden. Wir müssen uns daher auch bei den neuen Methoden auf eine Mitteilung des Princips und Anführung der entsprechenden wichtigsten Literatur beschränken.

Viscosimetrische Methode. Diese dient seit längerer Zeit bereits zur Messung der

69) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner,*** Adsorptionsanalyse d. Prot. u. ihrer Abbauprod. Ber. Chem. Ges., **60**, 1147 (1927). — 70) ***G. Klein, H. Linser,*** Colorimetr. Meth. z. quantit. Best. von Glykokoll. Zs. phys. Chem. **205**, 251 (1932). — 71) ***E. Abderhalden, A. Neumann,*** Verw. d. Orthophthaldialdehyds zum Nachw. von Glykokoll etc. Zs. phys. Chem., **238**, 177 (1935). S.A. — 72) ***O. Fürth, R. Scholl, H. Herrmann,*** Eine Mikrobest. des Alanins in Prot. Bioch. Zs., **251**, 404 (1932). — 73) ***O. Folin, A. D. Marenzi,*** An improved colorimetr. meth. for the determ. of cystin in prod. Jl. of Biol. Chem., **83**, 103 (1929). — 74) ***D. B. Jones, Ch. E. F. Gersdorff,*** Rate of lib. . . . some observ. on colorimetr. tests for cystine etc. Jl. of Biol. Chem., **101**, 657 (1933). — 75) ***A. Hunter, I. A. Dauphinee,*** Determ. of arginine by the use of arginase etc. Jl. of Biol. Chem., **63**, 1 (1925). — 76) ***F. Lieben, H. Lieber,*** Abspalt. v. Arginin aus den Eiweißverb. durch Ferm. Bioch. Zs., **275**, 38 (1935). — 77) ***K. Lang,*** Mechanism. d. Diacetylreak. v. Guanidinen etc. Zs. phys. Chem., **208**, 273 (278) (1932). — 78) ***H. Pfeiffer, F. Standenath,*** Peptidasenhaush. d. Mensch. u. d. Versuchstiere. Fermentforsch., **8**, 327 (1925). S.A. — 79) ***O. Folin c.s.,*** On tyrosine and tryptophane determ. in prot. Jl. of Biol. Chem., **73**, 627 (1927), **83**, 89 (1929). — 80) ***W. D. McFarlane, H. L. Fulmer,*** The colorimetr. determ. of the tyrosine a. tryptophan etc. Biochem. Jl., **24**, 1601 (1930). — 81) ***M. Bergmann,*** Determ. of l-proline with the aid of rhodanilic acid. Jl. of Biol. Chem., **110**, 471 (1935). — 81a) ***A. Ch. Chibnall, R. G. Westall,*** Estim. of glutamine in the pres. of asparagin. Biochem. Jl., **26**, 122 (1932).

Labwirkung; vgl. hierzu H.W. Bd. III, S. 1065. Anwendung auf die Verfolgung der Labgerinnung der Milch LÜERS 82).

Exacter als mit dem von LÜERS benutzten und im H.W. Bd. III, S. 127 ausführlich beschriebenen OSTWALD'schen Capillar-viscosimeter läßt sich die Gerinnung von Milch oder Caseinlösungen bei Lab-einwirkung nach HOLTER 83) mit dem Mikro-torsionsviscosimeter nach LECOMTE DU NOÜY bestimmen. BLAZSÓ 84) bestimmt die Viscosität von Gelatine, indem er das Stalagmometerrohr von RONA mit einem Viscosimeter nach OSTWALD kombinirt.

Die Viscositätsänderung isoelektrischer Gelatine eignet sich nach NORTHROP 85) zur Pepsinbestimmung und nach NORTHROP 86), SMITH (l. c. 66) auch zur Bestimmung der Gelatinase.

Für die Pepsinbestimmung ist sie aber nur bei Reinpräparaten exakt. Bei Rohpräparaten mit wechselndem Gehalt an Gelatinase geht die Visc. nicht mit den Spaltungswerten parallel. Nach NORTHROP (vgl. § 478a) geht die Visc.-Änderung der nachweisbaren Hydrolyse voraus.

Bei Arbeiten nach dieser Methode ist darauf zu achten, daß sich die Viscosität bei verschiedenen Substraten verschieden verhalten kann; während sie bei der Spaltung von Gelatine regelmäßig abnimmt, tritt nach WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 42) z. B. bei Casein ein Maximum der Viscosität während der peptischen Spaltung ein. Aus dem Verlauf der Kurve bei der Viscositätsänderung des Caseins kann jedoch nach SMORODINZEW und ADOWA 86a) direkt auf den Pepsingehalt des Präparats geschlossen werden. — Modifikation der Methode von NORTHROP (s. H.W. S. 859), ROTHSTEIN 87). — Anwendung der Viscositätsmessung zur Bestimmung der antitryptischen Wirkung des Blutserums FLEXNER c.s. 88).

Dilatometrische Methode. Es wird die Volumenänderung von Enzym-Substrat-Gemischen gemessen (SREENIVASAYA c.s. 89—91)). Die Auschläge beruhen nach THEIS 94) auf der Hydratation der Eiweißkörper während des proteolytischen Abbaus.

Nach dieser Methode können SREENIVASAYA c.s. 89) bereits in den ersten 30 bis 40 Minuten der Einwirkung, in denen noch keine chemischen Abweichungen bestimmbar sind, eine Änderung des Volumens feststellen. Nach dieser initialen Periode ist die Volumenabnahme bei tryptischer Verdauung von Globulinen, Casein und Gelatine nach 89—91) der Zunahme des Amino-stickstoffs streng proportional. Auch bei tryptischer Verdauung von Kuhmilch und Caseinlösung (bei ph = 7,7) ergeben sich mit der Aminogruppen-bestimmung nach LINDERSTRØM-LANG (s. § 492) gut übereinstimmende Werte (92). Es ist für diese Untersuchungen ohne Belang, ob Milch oder künstliche Caseinlösungen angewandt werden (92). Mit Casein (HAMMARSTEN) als Standard kann die relative tryptische Verdaulichkeit bestimmt werden (90).

Bei der peptischen Verdauung von Gelatine ist jedoch die Proportionalität nur annähernd gewahrt (89), (91); und bei peptischer Hydrolyse von Caseinogen fanden

---

82) ***H. Lüers, A. Diem,*** Adsorptionsreinigung d. Labenz. u. neue Meth. z. Ermittl. d. Labkonz. Milchw. Forsch., 2, 405 (1925). S.A. — 83) ***H. Holter,*** Labwirkung. Bioch. Zs., **255**, 160 (1932). — 84) ***S. Blazsó,*** Zusammenh. d. Hautatm. u. d. Gelatinase-Geh. d. Haut etc. Magy. Orv. Arch., **33**, 383 (1932); BPh **72**, 623. — 85) ***J. H. Northrop,*** Pepsin activ. units a. meth. for determ. of peptic activ. Jl. of gen. Phys., **16**, 41 (1932/3). — 86) ***J. H. Northrop,*** The presence of a gelatin-liquefying enz. in crude pepsin.prep. Jl. of gen. Phys. **15**, 29 (1931). — 86a) ***I. A. Smorodinzew, A. N. Adowa,*** Bezieh. d. Akt. d. Pepsin-Praep. u. der Viscosität d. Verdau.-gemische. Fermentforsch., **13**, 36 (1931). — 87) ***K. Rothstein,*** The exact meth. of determ. of trypsin a. pepsin by the change of viscosity in inoculated gelatin solutions. XII. Internat. Physiol. Kongr. Stockholm 1926, S. 142; BPh **38**, 880. — 88) ***L. B. Flexner, J. Berkson, H. Winters, I. Wolman,*** Antitryptic titre in pregnancy etc. Proc. Soc. Exp. Biol., **26**, 592 (1928/9). — 89) ***M. Sreenivasaya, B. N. Sastri, H. B. Sreerangachar,*** Dilatometr. stud. in the proteoclast. degrad. of prot. Biochem. Jl., **28**, 351 (1934)); Curr. Sci. **2**, 49 (1933/4). — 90) ***H. B. Sreerangachar, M. Sreenivasaya,*** Dilatometr. determ. of the rel. dig. of proteins. Biochem. Jl., **29**, 291 (1935). — 91) ***M. Sreenivasaya, H. B. Sreerangachar,*** Dilatometr. stud. in the proteoclast. degrad. of prot. Biochem. Jl. **28**, 1219 (1934). — 92) ***K. Bhagvat, M. Sreenivasaya.*** A dilatometr. meth. for stud. the „in vitro" dig. of milks. Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B **2**, 316 (1935).

Sreenivasaya c.s. 91) überhaupt keine Beziehung zwischen der Volumenverminderung und der Bildung von Amino-N; vgl. auch Rona und Fischgold 93).

Manometrische Methode. Nähere Beschreibung der Apparatur s. H.W. Bd. III, S. 635. Da Dipeptide größere Acidität besitzen als die Aminosäuren, so werden die Lösungen bei der Spaltung der Peptide alkalischer und können demnach CO_2 absorbiren. Der Grad der Spaltung kann daher nach Krebs 95) bei Anwendung einer CO_2-Atmosphäre über der Ferment-substratlösung oder bei Benutzung carbonat-haltiger Lösungen durch Veränderung des CO_2-Druckes bestimmt werden. Die Berechnung des Amino-N hieraus s. Krebs 96). Die auf diese Weise bestimmte Amino-N Menge stimmt mit der nach van Slyke und auf polarimetrischem Wege gefundenen überein.

Ein Vergleich der manometrischen Messung der Peptidspaltung mit der titrimetrischen Amino-N-Bestimmung nach Linderstrøm-Lang (s. S. 711) ergab bei Benutzung von Ringer-Bicarbonat-Puffer gut übereinstimmende Werte. Für stärker gepufferte Lösungen ist sie nach Oelkers (l. c. 55a) jedoch nicht zu verwerten.

Elektrometrische Methode. Genauere Angaben über die Apparatur und über die Art der Ausführung einer Bestimmung findet man im H.W. Bd. III, S. 178. Elektrometrische Verfolgung der peptischen Gelatineverdauung mit platinirten und palladinirten Pt-Elektroden s. Cannan 97).

Die Leitfähigkeitstitration ergibt bei Pepsin- und Papain-verdauung analoge Werte wie die Amino-N-bestimmung nach van Slyke bei einem ph der Ferment-substrat-lösung unter 1,3 und über 6,8 (98).

Zwischen ph = 1,3 und ph = 3 sinkt die Leitfähigkeit nach Baernstein 98) schneller, als das Amino-N ansteigt; oberhalb ph = 3 ist es umgekehrt: die Leitfähigkeit steigt wieder an, aber langsamer als das Amino-N, bis bei ph = 6,8 wieder beide Kurven zusammenfallen. Die Unregelmäßigkeiten werden durch die Abbauprodukte hervorgerufen. Die Untersuchung des Einflusses der Abbauprodukte auf die Leitfähigkeit bei verschiedenem ph durch Baernstein zeigt daher, daß die Methode zur Bestimmung des opt. ph bei peptischer Verdauung ungeeignet ist.

Bestimmung des Oberflächenpotentials von Pufferlösungen, auf denen ein Eiweißfilm ausgespreitet ist, vor und nach Zusatz von Ferment kann nach Schulman c.s. 99), 100) gleichfalls zur Messung der Verdauung benutzt werden. Auf die wesentlichen und interessanten Ergebnisse, die bereits mit dieser neuen Methode erzielt worden sind, kommen wir an anderer Stelle zurück.

Interferometrische Methode. Einrichtung und Benutzung des Interferometers sind im H.W. Bd. III, S. 45, 960 beschrieben. Interferometrische Pepsinbestimmung auch für klinische Anwendung s. Ochiai 101).

Refraktometrische Methode. Eine ausführliche Beschreibung des Refraktometers und seiner Anwendung findet sich im H.W. Bd. III, S. 20, 957. Quantitative Ausgestaltung und Ausbau zu Mikromethoden s. Kupelwieser c.s. 102). Messung der Caseinspaltung zur Bestimmung von Trypsin, Trypsinogen und Enterokinase Bates und Koch 103), von Pepsin

93) ***P. Rona, H. Fischgold,*** Dilatometr. Unters. bei der Spalt. von Eiweißkörpern u. ihren Bausteinen. II. Bioch. Zs., **261**, 366 (1933). S.A. — 94) ***E. R. Theis,*** Physicochem. meth. of measuring the act. of pepsin. Jl. Amer. Pharm. Assoc., **20**, 355 (1931). — 95) ***H. A. Krebs, J. F. Donegan,*** Manometr. Messung d. Peptidspalt. Bioch. Zs., **210**, 7 (1929). — 96) ***H. A. Krebs,*** Manometr. Messung d. fermentat. Eiweißspalt. Bioch. Zs., **220**, 283 (1930). — 97) ***R. K. Cannan, E. Muntwyler,*** The action of pepsin on gelatin. Biochem. Jl., **24**, 1012 (1930). — 98) ***H. D. Baernstein,*** The conduct. meth. a. proteol. Jl. of Biol. Chem., **74**, 351, **78**, 481 (1927/8). — 99) ***J. H. Schulman, E. K. Rideal,*** On monolayers of proteol. enz. a. prot. Biochem. Jl., **27**, 1581 (1933). S.A.; s. auch Proc. Roy. Soc. London, A. **130**, 259 (1930/1). — 100) ***J. H. Schulman, A. H. Hughes,*** Enz. react. a. penetrat. of prot. monolayers. Biochem. Jl., **29**, 1236 (1935). S.A.; s. auch Proc. Roy. Soc. London, A. **138**, 430 (1932). — 101) ***K. Ochiai,*** On the interferometr. estim. of pepsin etc. Jl. oriental med. **5**, Nr. 5, S. 66 (1926). — 102) ***E. Kupelwieser c.s.,*** Vers. über die Nachweisbark. immunisat. bed. Ferm.-proz. I. bis VII. Bioch. Zs., **145**, 492, 505, **160**, 75, 88, **178**, 298, 319, 324 (1924/6); ***K. Singer,*** VIII. ebenda **178**, 332 (1926). — 103) ***R. W. Bates, F. C. Koch,*** Assay meth. for trypsinogen a. enterokinase. Jl. of Biol. Chem., **111**, 197 (1935); BPh **91**, 417.

UTKIN 104), von Trypsin SMORODINZEW 105). Bestimmung der Enterokinase mit Trypsin als Substrat BATES 106). Pepsinbestimmung mit Fibrinkörnern MOZOLOWSKI und HILAROWICZ (l. c. 9).

Nephelometrische Methode. Die Theorie der Methode und die Handhabung des Nephelometers, sowie allgemeine Vorschriften für die Nephelometrie sind von KLEINMANN im H.W. Bd. III, S. 60 beschrieben. Die Methode ist von RONA und KLEINMANN 107) für die Bestimmung von Fermenten eingeführt worden. Das Princip der Pepsin- und Trypsin-bestimmung besteht in einer nephelometrischen Messung der im ungespalten gebliebenen Substrat hervorgerufenen Trübung.

Für die Pepsinbestimmung dienen als Substrat hochverdünnte Lösungen von Serumeiweiß oder Casein (108), für die Trypsinbestimmung hochverdünnte Natrium-caseinat-lösungen, in denen nach erfolgter Fermenteinwirkung durch Zusatz von Chinin-hydrochlorid die entsprechende Trübung erzeugt wird (109); Näheres hierüber s. im H.W. Bd. III, S. 1050 bezw. 1060.

Bestimmung von Gelatine durch Trübung der Lösung nach Zusatz von Sulfosalicylsäure KLEINMANN und STERN 110). Bestimmung anderer Substrate, wie Edestin, Serumalbumin und Eigeneiweiß (von Glycerinextracten tierischer Gewebe) RONA und KLEINMANN 111), sowie VAN ARKEL 112), KLEINMANN 113). Zur Bestimmung sehr kleiner Mengen Pepsin eignen sich nach KRIJGSMANN 114) Edestin und Serumeiweiß besser als Casein, da sie leichter angegriffen werden. Auch zur Bestimmung von Kathepsin kann nach STERN 115) Edestin benutzt werden, das also besonders für vergleichende Untersuchungen über alle drei Proteinasen als Substrat in Frage kommt.

Mikrobestimmung von Trypsin und Kathepsin mit Casein als Substrat s. KRIJGSMANN 116), von Pepsin mit Edestin als Substrat s. KRIJGSMANN 114).

Modifikation für klinische Zwecke s. RONA und KLEINMANN 117). Diese wird von VAN ARKEL 112) als Vorschrift der Pepsinbestimmung für die Pharmakopoe vorgeschlagen.

Auf dem gleichen Princip wie die Nephelometrie beruht die von HERZFELD 118) angegebene **Tyndallometrische Methode** zur Pepsinbestimmung, bei der als Substrat gekochtes Rinderserum dient.

Schwärzungsmessung. Von BERGMANN und DIETSCHE 119) ist eine Methode ausgearbeitet worden, die darauf beruht, daß bei Auflösung von Gelatine aus photographischen Gelatine-emulsionen eine entsprechende Menge Silber herausgewaschen wird. Zu diesem Zweck wird die Schwärzung von Graukeilen aus stufenweise belichteter photographischer Gelatine-emulsion vor und nach Einwirkung von Beizenzymen (Trypsin) verglichen. Die Methode hat nach BERGMANN und FÖHR 120) den Vorteil, daß die Oberfläche des Substrats bekannt ist und beliebig variirt werden kann.

---

104) ***L. Utkin,*** Quantit. Best. d. Pepsins. Bioch. Zs., **271,** 127 (1934). — 105) ***J. Smorodinzew, A. Adowa,*** Das ph-Opt. bei d. Caseinverdau. durch Trypsin. Russk. fiziol. Z., **10,** Heft 5, S. 339 (1927); BPh **44,** 293. — 106) ***R. W. Bates,*** Meth. for the determ. of enterokinase. Proc. Soc. experim. Biol. Med., **28,** 1055 (1930/1). — 107) ***P. Rona, H. Kleinmann,*** Meth. z. Best. kleinster Eiweißmengen. Bioch. Zs., **140,** 161 (1923). — 108) ***Dies.,*** Nephelometr. Unters. über fermentat. Eiweißspalt. Bioch. Zs., **140,** 478 (1923), **150,** 444 (1924), **155,** 34, **159,** 146 (1925). — 109) ***Dies.,*** Nephelometr. Unters. über fermentat. Eiweißspalt. Bioch. Zs., **155,** 34 (1925), **169,** 320, **177,** 89, 107 (1926), **196,** 177 (1928). — 110) ***H. Kleinmann, K. G. Stern,*** Unters. über tier. Gewebsproteasen. I. Bioch. Zs., **222,** 31 (1930). — 111) ***P. Rona, H. Kleinmann,*** Unters. über tier. Gewebsproteasen. VI. Biochem. Zs., **241,** 283 (1931). S.A. — 112) ***C. G. van Arkel,*** Nephelometr. Best. des Pepsins. Chem. Weekblad, **66,** 857 (1929). — 113) ***H. Kleinmann, F. Werr,*** Unters. über tier. Gewebsproteasen. Bioch. Zs., **241,** 108 (1931). — 114) ***B. J. Krijgsman,*** Nephelometr. Mikrobest. v. Pepsin. Zs. phys. Chem. **227,** 251 (1934). — 115) ***K. G. Stern,*** Edestin als Substrat für die nephelometr. Best. proteol. Enz. Bioch. Zs., **236,** 464 (1931). — 116) ***B. J. Krijgsman,*** Nephelometr. Mikrobest. v. Trypsin u. Kathepsin. Zs. phys. Chem., **228,** 256 (1934). — 117) ***P. Rona, H. Kleinmann,*** Nephelometr. Meth. z. Best. v. Trypsin u. Pepsin etc. Klin. Ws., **6,** 1174 (1927). — 118) ***E. Herzfeld,*** Eine tyndallmetr. Pepsinbest.-Meth. Bioch. Zs., **251,** 384 (1932). — 119) ***M. Bergmann, O. Dietsche,*** Neue Bestimmungsmeth. proteol. Beizenz. Collegium **1929,** 583. S.A. — 120) ***M. Bergmann, F. Föhr,*** Einw. v. Pankreatin auf Gelatineoberflächen, Bioch. Zs., **250,** 568 (1932). S.A.

Auf demselben Princip beruht die neue Methode von GATES **121)**. Wird ein Stück einer belichteten und entwickelten photographischen Platte (oder eines Films) mit der Silberschicht nach unten auf eine mit der Enzymlösung gefüllte Kammer gelegt, so wird bei der tryptischen oder peptischen Verdauung der Gelatine auch eine entsprechende Silbermenge mit abgelöst. Nach der Verdauung wird nach Ablösen der Emulsion von der Platte mit heißem Wasser der Ag-Gehalt derselben mit dem eines entsprechenden nicht benutzten Stückes kolorimetrisch verglichen, woraus der Grad der enzymatischen Einwirkung berechnet werden kann. Herstellung einer Eichkurve mit käuflichem Pepsin und technische Verbesserungen der Methode GILMAN und COWGILL **122)**; vgl. auch OSTERBERG c.s. **123)**, die die Methode als sehr zuverlässig für die Pepsinbestimmung fanden. Die Gelatinase wird jedoch nach dieser Methode nach SMITH (l. c. 66) nicht mit erfaßt.

§ 496. Anhang: Nachweis der **Abderhaldenschen Reaktion.**

Die Versuche zur Nachweisbarkeit immunisatorisch bedingter Fermentprozesse sind im H.W. Bd. III, S. 1079 mitgeteilt; vgl. auch die Zusammenfassung von HIRSCH **126)**. Neuere Angaben über den Nachweis der ABDERHALDEN'schen Reaktion auf interferometrischem und refraktometrischem Wege s. ABDERHALDEN **124)**, KÜSTER und KOULEN **125)**. KUPELWIESER c.s. (l. c. 102) können sie weder auf diese Weise noch unter Benutzung verschiedener anderer Methoden nachweisen.

---

121) ***F. L. Gates,*** A meth. of titrat. proteol. enz. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 24, 936 (1927); Science (N. Y.), **72,** 147 (1930). — 122) ***A. Gilman, G. R. Cowgill,*** Determ. of peptic act. etc. Jl. of Biol. Chem., **88,** 743 (1930). — 123) ***E. A. Osterberg, F. R. Vanzant, W. C. Alvarez,*** Stud. of gastric pepsin. Jl. of clin. Invest., **12,** 551 (1933). — 124) ***E. Abderhalden*** (***S. Buadze***), Neue Forsch. über den Nachw. u. das Wesen der ABDERHALDENschen Reakt. Med. Klin., **23,** Nr. 46, 1762 (1927); BPh **45,** 114; Fermentforsch., **9,** 392 (1928), **10,** 111 (1928), **11,** 305, 361 (1930), **13,** 363 (1932), **15,** 94 (1936). S.A. — 125) ***E. Küster, K. Koulen,*** Experim. Unters. z. interferometer. u. chem. Nachw. v. ABDERHALDENschen Serum-Ferm. Fermentforsch., **9,** 265 (1928). — 126) ***P. Hirsch,*** Die ABDERHALDENsche Reak. mittels d. quant. interferometr. Meth. etc. Klin. Ws., **4,** Nr. 28 u. 29 (1925).

C. Peptidasen.

(mitbearbeitet von Dr. W. ROMAN).

I. Allgemeines.

1) Allgemeine Principien der Wirksamkeit.

§ 497. Wie bereits in der allgemeinen Einführung (§§ 458, 459) dargelegt wurde, spalten die Fermente der Gruppe der Peptidasen die Peptidbindung — CO-NH — vor allem in den normalen natürlichen Peptiden. Genuine Proteine werden in keinem Fall von reinen Peptidasen angegriffen. Wie weit ein Angriff der dazwischen liegenden Gruppe von Eiweißabbauprodukten, der „Peptone", erfolgt, ist noch nicht sicher. Es hängt diese Frage ja mit dem noch vollständig ungeklärten Bau jener Stoffe zusammen, was bereits verschiedentlich in den §§ 457, 458, 477 und 479a besprochen wurde. Sie werden enzymtypisch als ein Gemisch von Proteinen und Polypeptiden angesehen und dementsprechend auch von Polypeptidasen angegriffen; jedoch läßt sich natürlich hierbei noch kein allgemeines Princip feststellen. Nur Dipeptidasen wirken garnicht; andererseits scheint das neue Ferment von BERGMANN c.s. **127)** (s.a. § 479a), die Papain-polypeptidase, speciell auf Peptone zu wirken; vielleicht haben wir in ihr die theoretisch schon lange gesuchte „Peptonase" zu sehen.

Eine weitere, von den Peptidasen im allgemeinen nicht angreifbare Übergangsgruppe stellen die Protamine (s. § 477) dar. Es existirt jedoch auch hier wieder ein Sonderenzym, die Protaminase, die speciell diese Stoffe angreift und so ein Übergangsglied zwischen den Proteinasen und den Peptidasen, und zwar Carboxy-polypeptidasen, bildet.

Außer diesen Übergangsgliedern „nach oben" gibt es noch verschiedene Übergangsglieder „nach unten", also Sonderenzyme, die auch solche Stoffe spalten, welche keine eigentlichen Peptide (im allerstrengsten Sinne) mehr sind. Sie stellen also die Verbindungsglieder zwischen den echten Peptidasen und den Acylamidasen (s. § 444) dar. Hierzu sind zunächst die beiden Fermente zu zählen, die auf die Peptide des Prolins einwirken. Es sind dies erstens die Prolylpeptidase (Prolinase, Imino-polypeptidase) von GRASSMANN **128)** (l. c. 180), die Di- und Polypeptide vom Typus des Prolyl-glycins spaltet, also solche Stoffe, in denen die Carboxylgruppe des Prolins die Peptidbindung herstellt; zweitens die Prolinpeptidase von BERGMANN c.s. **129)** (s.a. § 479), die auf Prolinpeptide vom Typus des Glycyl-prolins einwirkt, in denen also die Iminogruppe des Prolins peptidisch gebunden ist. Weiterhin sind hier noch die Dehydropeptidase von

---

127) ***M. Bergmann c.s.,*** On the spec. of papain VI—VIII. Jl. of Biol. Chem., **111**, 225 (232), 245, 659 (1935). S.A. — 128) ***W. Graßmann,*** Neue Ergebn. auf d. Geb. d. eiweißspalt. Enz. Collegium, **11**, 549 (553) (1934). S.A. — 129) ***M. Bergmann c.s.,*** Proteol. Ferm., Verh. von Prolinpeptiden. Zs. phys. Chem., **212**, 72 (1932). S.A.

Bergmann's **130)** und die Acylasen von Abderhalden **131)** (l. c. 172) zu nennen, sowie das von diesen verschiedene **(131)** tryptische Enzym von Balls und Köhler (l. c. 173), das specifisch auf Chloracetyl-o-nitranilin eingestellt zu sein scheint. Auf Einzelheiten und weitere noch nicht sichergestellte Sonderenzyme kommen wir weiter unten (§ 502) zurück.

Da, wie oben ausgeführt, die Frage der Spaltbarkeit höherer Eiweißabbauprodukte durch Peptidasen noch weitgehend ungeklärt ist, muß hier von vornherein betont werden, daß nur solche Untersuchungen zur Erforschung der Peptidasen und besonders ihrer Specifität geeignet sind, die an chemisch definirten Polypeptiden, und zwar meist solchen synthetischer Herkunft, angestellt worden sind.

Wenn wir also von allen Sondergruppirungen und Sonderenzymen absehen, kommen wir zu folgender allgemeiner Definition der Peptidasen: Peptidasen spalten alle natürlichen Peptide unter Lösung der CO-NH-Bindung und legen aus ihnen die Aminosäuren frei. Von synthetischen Peptiden werden solche, welche die geeignete sterische Konfiguration haben, gespalten. Hierbei ist zu betonen, daß in den allermeisten Fällen dieses Postulat mit dem der Zugehörigkeit zur l-Reihe zusammenfällt; doch gibt es auch hiervon Ausnahmen, und zwar in doppelter Hinsicht: Erstens kann nach Bergmann unter Umständen ein Polypeptid der d-Reihe die geeignete Konfiguration haben, vgl. § 480; zweitens verliert die sterische Konfiguration eines Gliedes vielfach ihre Bedeutung, wenn das Glied weit genug von der Angriffsgruppe entfernt ist; in diesem Fall werden auch racemische Verbindungen gespalten, Näheres s. § 502.

Nach der Kettenlänge der Substrate ergeben sich nun von selbst zwei Untergruppen: die Polypeptidasen spalten höhere Peptide mit drei und mehr Gliedern; die Dipeptidasen zerlegen die Dipeptide in zwei Aminosäuren. Auf die merkwürdige Tatsache, daß die Specifität nach der Kettenlänge bereits bei den Dipeptiden haltmacht und alle höheren Peptide, soweit sie noch eine definirte Peptidstruktur besitzen, von den gleichen Enzymen gespalten werden, ist bereits § 480 eingegangen worden. Wenn also auch für verschieden lange Polypeptidketten kein Unterschied in der Specifität der Polypeptidasen nach der Kettenlänge besteht, so scheiden sich diese doch, und zwar nach der Affinität zu einem bestimmten Angriffspunkt, in die beiden Untergruppen der Amino-polypeptidasen und der Carboxy-polypeptidasen.

Die Amino-polypeptidase ist (wenn man von der sie ständig begleitenden und daher nach Bergmann vielleicht mit ihr identischen Prolinpeptidase *) absieht) ein einheitliches Enzym (Balls und Köhler **132)**, Waldschmidt-Leitz **133)**), das nach der Definition von Grassmann (l. c. 128) alle Polypeptide vom Tripeptid aufwärts, aber keine Dipeptide oder Eiweißkörper spaltet. Und zwar erfolgt der Angriff immer so, daß die am Aminoende der Kette stehende Aminosäure abgespalten wird. Gehört diese nicht der l-Reihe an oder ist ihre Aminogruppe durch einen Substituenten blockirt, so unterbleibt der Angriff, vgl. a. § 479a und § 502. Dagegen werden Peptid-ester und Amide, in denen also die Carboxylgruppe besetzt ist, von Amino-polypeptidase gespalten (Linderstrøm-Lang **134)**).

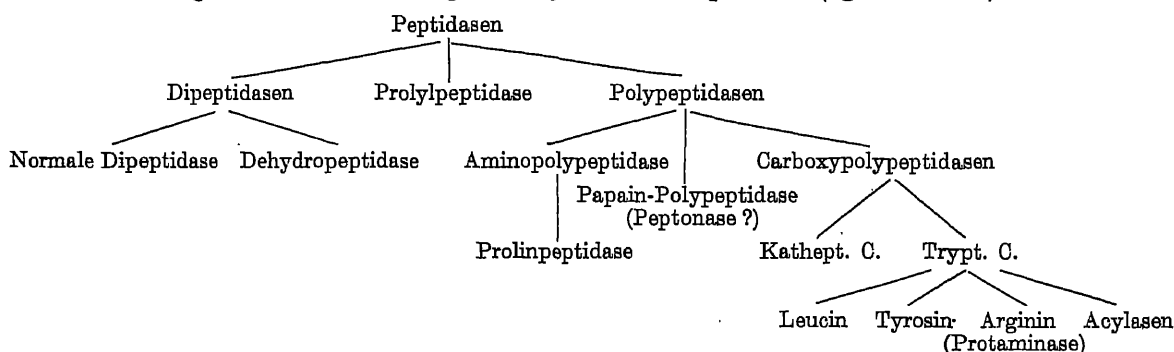
*) Anm. bei der Revision. Nach einer Mitt. von Bergmann (1936) läßt sie sich durch ihre Hemmbarkeit durch Cyanid von der Aminopol. unterscheiden, s. § 500a.

130) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Enzymat. Spalt. dehydrirter Peptide. Naturw., **18**, 832 (1930); Zs. phys. Chem., **205**, 65 (1932). S.A. — 131) ***E. Abderhalden c.s.,*** Z. Frage d. Ident. d. Chloracetyl-l-alanin spalt. Komponente von Erepsinlösung etc. Fermentforsch., **13**, 408 (1932). S.A. — 132) ***A. K. Balls, F. Köhler,*** Über Aminopolypeptidase. Zs. phys. Chem., **205**, 157 (1932), **219**, 128 (1933). S.A. — 133) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Proteasen. Zs. angew. Chem., **47**, 475 (478) (1934). S.A. — 134) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Neuere Unters. über die Anw. von Enz. z. Konst.-ermittl. d. Prot. Ergebn. Physiol., **35**, 415 (1933). S.A.

Ein Übergangsglied zwischen Dipeptidase und Carboxy-polypeptidasen stellt die Prolylpeptidase (Prolinase) GRASSMANN's dar, die sowohl Di- wie Tripeptide mit endständiger Prolingruppe spaltet. Systematisch kann man sie auffassen als eine Carboxy-polypeptidase, die ausnahmsweise auch auf Dipeptide wirkt, und zwar deswegen, weil hier die sonst hemmende benachbarte Aminogruppe nicht vorhanden ist.

Die Carboxy-polypeptidasen spalten umgekehrt stets die am Carboxylende stehende Aminosäure ab und können demnach nicht wirken, wenn diese verändert oder blockirt ist. Sie werden unterteilt in die (bisher noch wenig untersuchten) katheptischen und die tryptischen Carboxy-polypeptidasen. Diese beiden finden sich fast stets zusammen mit der entsprechenden Proteinase und können ebenso wie diese auch in ihrer Wirkung durch den gleichen Aktivator unterstützt werden. Zu den tryptischen Carboxy-polypeptidasen gehören neben den bereits besprochenen Acylasen von ABDERHALDEN (l. c. 131, 172) und von BALLS und KÖHLER (l. c. 173), sowie der Protaminase (Arginin-polypeptidase), die speciell auf die Tyrosin- bezw. Leucingruppe eingestellte Tyrosin- und Leucin-carboxy-polypeptidase, vgl. auch § 479a und § 502. Es existiren jedoch möglicherweise noch zahlreiche weitere zur Gruppe der Carboxy-polypeptidasen gehörende Fermente.

Die normale Dipeptidase stellt wieder ein einheitliches Enzym dar und greift alle aus natürlichen α-Aminosäuren der l-Reihe aufgebauten Dipeptide sowie einige wenige der d-Reihe an. Sie spaltet also nur (aber auch stets) solche OC-NH-Bindungen, denen zugleich eine freie α-Aminogruppe und eine freie COOH-Gruppe benachbart ist (GRASSMANN **135)**, BERGMANN **136)**). Auf die eventuelle Existenz zweier, relativ zu Leucin- bezw. Alanin-peptiden specifischen Dipeptidasen kommen wir weiter unten (§ 500—502) noch zurück. Die anderen, oben erwähnten Dipeptide spaltenden Fermente sind Sonderenzyme, die nur in ihrer Wirkung, aber nicht genetisch mit der normalen Dipeptidase verknüpft sind.

Es ergibt sich demnach folgendes System der Peptidasen (vgl. a. S. 627):

Alle diese Enzyme werden in den folgenden Kapiteln gemeinsam behandelt, da sie in ihrer Wirkung und Specifität innig verknüpft sind und z. T. bisher auch präparativ nicht getrennt werden konnten. Wenn nicht besondere Gründe (wie z.B. bei der Darstellung, § 498) vorliegen, werden wir die einzelnen Enzyme in folgender Reihenfolge behandeln: Dipeptidase, Dehydropeptidase, Prolylpeptidase, Prolinpeptidase, Amino-polypeptidase, Papain-polypeptidase, tryptische Carboxy-polypeptidase, Leucin-polypeptidase, Tyrosin-polypeptidase, Protaminase, Acylasen, katheptische Carboxy-polypeptidase.

135) ***W. Graßmann, F. Schneider***, Spezif. d. Dipeptidase. Bioch. Zs., **273**, 452 (457) (1934). S.A. — 136) ***M. Bergmann, L. Zervas***, Wirkgsw. u. Spezif. von Dipeptidase. Zs. phys. Chem., **224**, 11 (1934). S.A.

2) Geschichte.

Im H.W. S. 863 mußte es als noch sehr schwierig bezeichnet werden, die Peptidasen von den Proteinasen abzugrenzen, wenn es auch bereits als sehr wahrscheinlich betrachtet werden konnte, daß „Trypsin" Peptidasen enthält und zu diesen auch die „Erepsine" des Pankreas, des Darms, der Gewebe und Organe gehören. Eine erste einwandfreie Klärung dieser Frage wurde durch die Arbeiten von WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 137) erzielt, die eine präparative scharfe Trennung von „Trypsin" und „Erepsin" im Pankreas durchführten und kurz darauf auch zeigen konnten, daß dieses Erepsin mit dem des Darmes identisch ist, und zwar sowohl bei den aus Drüsenmaterial gewonnenen als auch bei den natürlich secernirten Enzymgemischen (l. c. 151).

WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 137) stellten auch bereits in der gleichen Arbeit fest, daß sowohl Pankreas- als auch Darmerepsin nur Peptide, aber keine Peptone mehr oder gar genuine Eiweißkörper spaltet. Als verschieden vom Darm- und Pankreas-erepsin wurde jedoch zunächst das „Hefeerepsin" angesehen, da dieses nur Dipeptide spaltet, während die polypeptidspaltende Wirkung nach GRASSMANN 138) hier an das „Hefetrypsin" geknüpft war. Erst die weitere Aufteilung des „Hefetrypsins" durch GRASSMANN c.s. (l. c. 181, 183—186), einerseits und die Trennung der Amino-polypeptidase und der Dipeptidase des Pankreas durch WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 174) andererseits zeigten, daß es sich hier unabhängig vom Vorkommen um die gleichen Enzyme handelt. Hiermit war festgestellt, daß im tierischen und pflanzlichen Organismus die gleichen dipeptid- und polypeptidspaltenden Fermente vorkommen und daß die Dipeptidase gleich welcher Herkunft alle natürlichen Dipeptide spaltet (GRASSMANN und KLENK 139)) mit Ausnahme der Prolinpeptide vom Typus des Prolyl-glycins, für deren Spaltung GRASSMANN c.s. 140) ein neues Ferment, die Prolylpeptidase, in Glycerinextrakten aus Darmschleimhaut, sowie im Pankreas und in der Hefe fanden. Ein Prolinpeptide vom umgekehrten Typus des Glycyl-prolins spaltendes Ferment, die Prolin(poly)peptidase, fanden etwas später BERGMANN c.s. (l. c. 129) vergesellschaftet mit der Amino-polypeptidase der Darmschleimhaut und der Hefe.

Ein weiterer Schritt zur Aufteilung der Peptidasen und zur Erkenntnis ihrer Wirkung gelang WALDSCHMIDT-LEITZ und GRASSMANN 141); sie stellten fest, daß für die Specifität der Peptidasen neben der Kettenlänge auch die Struktur des Peptids maßgebend ist, indem nur aus Glycin zusammengesetzte Polypeptide vom „Erepsin" (d. h. Aminopolypeptidase), Leucyl-triglycyl-tyrosin dagegen vom „Trypsin" (d. h. Carboxy-polypeptidase) gespalten werden, nachdem bereits vorher v. EULER und JOSEPHSON 142) auf Grund von Hemmungsversuchen zu der Annahme gekommen waren, daß die Bindung des „Darmerepsins" an ein Substrat wenigstens zum Teil durch dessen freie Aminogruppe vermittelt wird, was von WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 143), 144) durch die gute Spaltbarkeit decarboxylirter Peptide und die Unangreifbarkeit acylirter Peptide durch „Darmerepsin" bezw. die umgekehrte Wirkung des „Trypsins" bestätigt wurde. Die Nicht-Einheitlichkeit des „Trypsinkomplexes" und die Existenz polypep-

137) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck***, Die spezif. Wirkg. von Pankreastryps. u. Pankreasereps. Zs. phys. Chem., **149**, 203 (209) (1925); ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner***, Z. K. d. Darmereps. Zs. phys. Chem., **151**, 31 (1926). — 138) ***W. Graßmann***, Über die Dipept. u. die Polypept. d. Hefe. Zs. phys. Chem., **167**, 202 (1927). S.A. — 139) ***W. Graßmann, L. Klenk***, Z. Frage d. Einheitl. tier. u. pflanzl. Dipeptidase. Zs. phys. Chem., **186**, 26 (1929). S.A. — 140) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff, O. v. Schoenebeck***, Enzymat. Spaltbark. d. Prolin-Pept. Ber. Chem. Ges., **62**, 1307 (1929). — 141) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann, H. Schlatter***, Z. Specif. proteol. Enz. Ber. Chem. Ges., **60**, 1906 (1927). S.A. — 142) ***H. v. Euler, K. Josephson***, Enzymat. Spalt. v. Dipeptiden. Zs. phys. Chem., **157**, 122 (124); **162**, 85 (1926/27). — 143) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann, A. Schäffner***, Specif. d. Peptidasen I. Ber. Chem. Ges., **60**, 359 (1927). S.A. — 144) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein***, Spez. u. Wirkgsw. v. Erepsin, Trypsin u. Trypsinkinase. Ber. Chem. Ges., **61**, 640 (1928). S.A.

Abgeschlossen: 30. 7. 36. Ber. Phys. 94, H. 1/2.

tidspaltender Enzyme im „Trypsin" wurde von ABDERHALDEN c.s. 145) bestätigt. WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR (l. c. 167) führten dann die Abtrennung der Carboxypolypeptidasen von der Proteinase des Trypsins durch; ABDERHALDEN c.s. (l. c. 168, 172) und BALLS und KÖHLER (l. c. 173) konnten dann noch eine weitere Aufteilung der Carboxy-polypeptidasen unter Abtrennung von Leucin- und Tyrosin-Carboxy-polypeptidasen, sowie von Acylasen vornehmen. Schließlich gelang WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 157) auch die Abtrennung der Arginin-Carboxy-polypeptidase, der Protaminase, von der Proteinase des Trypsins.

Nachdem so das System der Peptidasen in seinen Grundzügen, im wesentlichen bei Untersuchungen an den Enzymen des tierischen Verdauungstraktes und der Hefe festgelegt war, ergab sich nach den Arbeiten von WILLSTÄTTER und BAMANN 146), ABDERHALDEN und HERRMANN 147), GRASSMANN (l. c. 154) und besonders WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 148), daß tierische Organe ebenso wie der tierische Verdauungstrakt (Pankreas und Darm) und auch die Hefezellen vier Gruppen proteolytischer Enzyme ausbilden. Das proteolytische System von tierischen Organen und Hefezellen enthält ebenso wie das des Verdauungstraktes und auch der Leukocyten stets die (gleiche) Dipeptidase und Amino-polypeptidase. Nur in der Art der Proteinase treten Unterschiede auf, indem der Verdauungstrakt eine Proteinase vom Tryptase-Typ enthält, während in den Organen und der Hefe Papainasen und in den Leukocyten beide Arten von Proteinase vorkommen.

Dementsprechend konnte auch von WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 148) in den tierischen Organen eine katheptische Carboxy-polypeptidase in Analogie zur tryptischen Carboxy-polypeptidase des Verdauungstraktes festgestellt werden. Abgerundet wurde das Bild durch die Auffindung der katheptischen Carboxy-polypeptidase auch in der Hefe durch GRASSMANN 149), wonach also Hefe und Organe der Wirbeltiere die gleichen Enzyme besitzen. Schließlich wurde auch das proteolytische System des Verdauungstraktes von Wirbellosen von MANSOUR-BEK (l. c. 193) an *Maja squinado Latr.* genauer untersucht und festgestellt, daß es dem des Verdauungstraktes der Wirbeltiere analog ist: es enthält gleichfalls eine (wahrscheinlich tryptische) Proteinase und Carboxy-polypeptidase, sowie die Amino-polypeptidase und Dipeptidase.

Wenn hiermit auch die gruppenmäßige Einteilung der Peptidasen und das überall oder fast überall gleichmäßige Vorkommen dieser Gruppe feststeht, so ist doch damit nicht gesagt, daß nun schon alle peptidspaltenden Enzyme bekannt sind.

Erstens existiren neben diesen wichtigsten Enzymgruppen wahrscheinlich noch verschiedene Sonderenzyme mit ziemlich engem Specifitäts-bereich. So wurde neuerdings von BERGMANN (l. c. 130) ein auf dehydrirte Dipeptide eingestelltes Sonderferment der Niere, die Dehydropeptidase, und von S. OTANI (l. c. 160) gleichfalls in der Niere eine Sulfopeptidase entdeckt. Die letztere wurde von H. OTANI (l. c. 198) auch in *Aspergillus niger* aufgefunden. In letzter Zeit fand BERGMANN (l. c. 127) im Saft von *Carica papaya* dann noch ein neues, auch auf Peptone wirkendes Enzym, die Papain-polypeptidase.

Zweitens können diese Hauptgruppen noch weiter unterteilt werden. So ist ja der Sum-

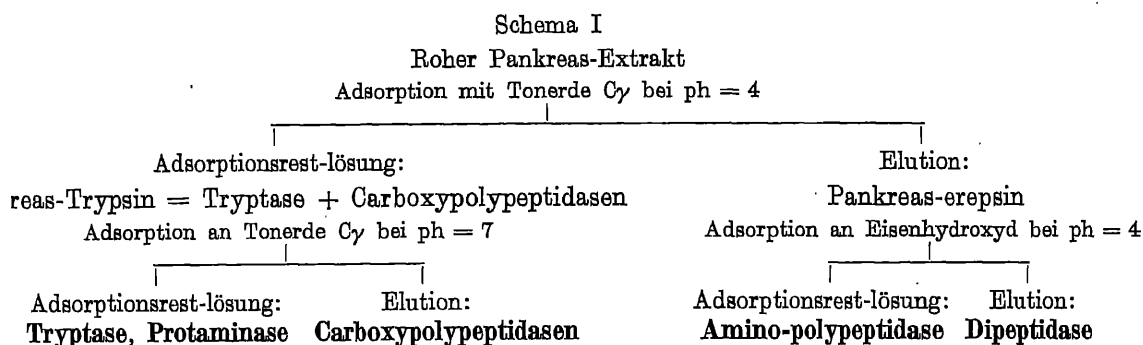
---

145) ***E. Abderhalden c.s.,*** Z. Frage d. Einheitl. d. Trypsinkomplexes. Fermentforsch., **10**, 474, 478, 481, **11**, 104 (1929). S.A. — 146) ***R. Willstätter, E. Bamann,*** Proteasen d. Magenschleimhaut. Zs. phys. Chem., **180**, 127 (1929); ***R. Willstätter, E. Bamann, M. Rohdewald,*** Z. K. d. proteol. Wirkg. farbl. Blutk. Zs. phys. Chem., **185**, 267 (1929). — 147) ***E. Abderhalden, O. Herrmann,*** Z. K. d. im Organ. ... Zellferm. Fermentforsch., **11**, 78 (1929). — 148) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.,*** Das proteol. System in tier. Organen. Zs. phys. Chem., **188**, 17 (1930). S.A.; Über d. proteol. Enz. in tier. Organ. u. Geweben. Amer. Jl. Phys., **90**, 549 (1929). — 149) ***W. Graßmann,*** Proteol. Enz. d. Tier- u. Pflanzenreiches. Ergebn. d. Enzymforsch., **1**, 129 (1932).

mencharakter der Carboxy-polypeptidasen bereits bekannt; es sind verschiedene Teilenzyme der Carboxy-polypeptidase bereits abgetrennt und z. T. auch schon rein dargestellt worden. Daß diese Entwicklung noch keineswegs abgeschlossen ist, und möglicherweise auch zu einer weiteren Aufteilung der beiden anderen Hauptgruppen, der normalen Dipeptidase und Amino-polypeptidase, führen kann, zeigt schon die, noch nicht abgeschlossene, Diskussion über die eventuelle Existenz zweier verschiedener Dipeptidasen, besonders im Malz, von LINDERSTRØM-LANG und SATO (l. c. 202, 203, 209) einerseits und RONA (l. c. 201) und GRASSMANN c.s. **139), 150)** andererseits.

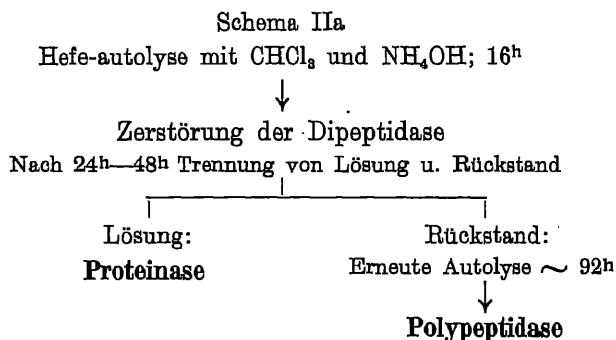
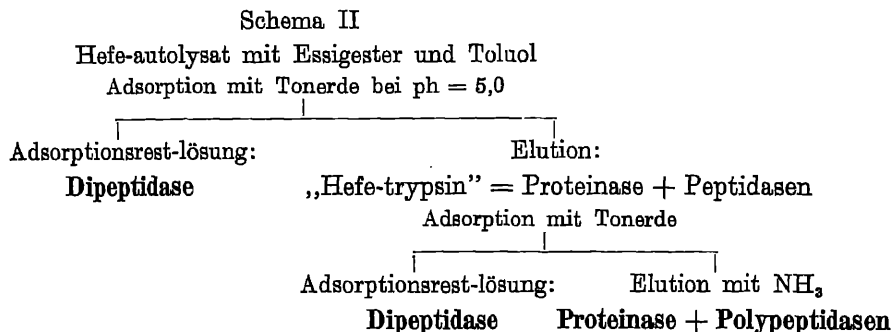
II. Darstellung.

§ 498. Zur Darstellung von Peptidasen wird meist vom Pankreas- oder Darmextrakt oder Hefe-autolysat ausgegangen; über die Herstellung dieser Extrakte, s. H.W., Bd. III, S. 428, 1007, 1024. Die natürlichen Sekrete des Pankreas und des Darmes, die an sich die gleichen Enzyme enthalten (s. § 497 und § 503 ff.), sind nach WALDSCHMIDT-LEITZ **151)** zur Darstellung weniger geeignet, ebensowenig die zahlreichen anderen Vorkommen der Peptidasen.

In **Extracten von Pankreas oder Darmschleimhaut** läßt sich zunächst eine Trennung in einen tryptischen und einen ereptischen Anteil vornehmen. Der tryptische Anteil enthält außer der Proteinase (s. § 517) die Carboxy-polypeptidasen einschließlich der Protaminase (WALDSCHMIDT-LEITZ **152)**), der ereptische Anteil die Dipeptidase und die Amino-polypeptidase. Diese Trennung kann ganz scharf erfolgen (LINDERSTRØM-LANG, l. c. 134, S. 430). In diesen beiden Teilen kann nun eine weitere Trennung vorgenommen werden, bei der Carboxy-polypeptidasen, Amino-polypeptidase, Dipeptidase und neuerdings auch die Protaminase jede für sich rein erhalten werden können. Diese Trennung in Protaminase und Tryptase einerseits und Carboxypolypeptidasen andererseits bezw. Amino-polypeptidasen einerseits und Dipeptidasen andererseits ist nach LINDERSTRØM-LANG (l. c. 134, S. 430) bei Pankreas weniger sicher. Es ergibt sich demnach folgendes Schema I nach LINDERSTRØM-LANG **153)** für die Trennung in Extrakten aus Pankreas oder Darm:

Anders liegen die Verhältnisse bei der **Hefe**, in der die Proteinase nach GRASSMANN **154)** eine Papainase darstellt, sodaß das abweichende Adsorptionsverhalten des „Hefetrypsins" von dem des „Pankreastrypsins", auf das GRASSMANN im H.W., Bd. III, S. 998 noch ausdrücklich

---

150) ***W. Graßmann, L. Klenk, T. Peters-Mayr,*** Z. K. d. Affinitätsverh. tier. u. pflanzl. Dipeptidase. Bioch. Zs., **280**, 307 (1935). — 151) ***E. Waldschmidt-Leitz, J. Waldschmidt-Graser,*** Die enzymat. Wirk. von Pankreas- und Darmsekret. Zs. phys. Chem., **166**, 247 (1927). S.A. — 152) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.,*** Über die Strukt. d. Protamine. Zs. phys. Chem., **197**, 219 (1931). S.A. — 154) ***W. Graßmann,*** Unters. über die Spec. proteol. Pflanzenenz. Habil. Schr. München 1928, S. 13 ff. und 48 ff. S.A.

hinwies, heute als selbstverständlich erscheint, ebenso auch, daß die Polypeptidasen mit der Proteinase zusammen adsorbirt und so zunächst von der Dipeptidase getrennt werden. Besser als durch fraktionirte Adsorption gelingt diese Trennung nach GRASSMANN **154)** (l. c. 149, S. 147) durch fraktionirte Autolyse der Hefe; es ist dies nach LINDERSTRØM-LANG (l. c. 134, S. 430) die beste Trennung, die bisher in der Proteasen-chemie überhaupt erzielt wurde. Auf die gleiche Weise gelingt nach GRASSMANN **154)** die Trennung der (Amino-)-Polypeptidasen von der Proteinase und (weniger gut) auch die Abtrennung der katheptischen Carboxy-polypeptidase. Es ergeben sich demnach folgende Trennungs-Schemata II bezw. IIa:

Die weitere Aufteilung der Amino-polypeptidasen und die Reindarstellung einzelner Komponenten ist bisher nicht gelungen; aus dem tryptischen Anteil des Pankreas jedoch konnten ABDERHALDEN und SCHWAB **156)** durch fraktionirte Adsorption (s. S. 727) neben der Proteinase eine Tyrosin-polypeptidase, eine oder wahrscheinlich ein Gemisch mehrerer Acylasen und eine Leucin-polypeptidase abtrennen. Bei den Acylasen ist ABDERHALDEN (l. c. 131) und BALLS und KÖHLER (l. c. 132) wahrscheinlich eine noch weitere präparative Aufteilung gelungen (s. S. 727). Auch die Protaminase konnte WALDSCHMIDT-LEITZ **157)** neuerdings rein darstellen.

Die neue Papain-polypeptidase (Peptonase) von BERGMANN **158)** läßt sich vorläufig von der Proteinase darstellungsmäßig nicht abtrennen; BERGMANN **158)** konnte bisher nur wirkungsreine Papain-proteinase (frei von Polypeptidase durch Inaktivirung der letzteren, s. § 500) herstellen, aber nicht umgekehrt reine Polypeptidase. Ebensowenig hat BERGMANN **159)**

156) ***E. Abderhalden, E. Schwab,*** Zum Problem d. specif. Einst. der Polypep. Fermentforsch., **12**, 432, 559 (1931). S.A. — 157) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Kofranyi,*** Darst. von Protaminase. Zs. phys. Chem., **222**, 148 (1933). — 158) ***M. Bergmann, W. F. Ross,*** Proteol. enz. Jl. of Biol. Chem., **111**, 659 (1935). — 159) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Enzymat. Spalt. dehydr. Peptide. Zs. phys. Chem., **205**, 65 (1932). S.A.

die Dehydropeptidase bisher rein dargestellt; ihre Wirkungsweise wurde an Glycerinextrakten aus Niere und gefaultem Pankreas geprüft. Das andere Sonderferment der Niere, die Sulfopeptidase, konnte S. OTANI 160) dagegen rein erhalten.

Außerdem wurde von ABDERHALDEN und EHRENWALL 160a) im Erepsin ein Ferment aufgefunden, das Chloracetyl-alanin und -leucin, aber nicht -tyrosin spaltet; dies Ferment wurde bisher nicht praeparativ dargestellt und es ist auch noch nicht sicher, ob is sich um ein selbstständiges Fermentindividuum handelt (s. § 502).

Wie sich aus diesen Darlegungen ergibt, ist das Adsorptionsverhalten der einzelnen Enzyme je nach ihrer Herkunft verschieden (s. a. § 499) und dementsprechend auch die Art des anzuwendenden Trennungsganges, sodaß die hier gegebenen Trennungs-Schemata nur für die beiden wichtigsten Gruppen von Ausgangsmaterial (Pankreas und Darmschleimhaut einerseits und Hefe andererseits) gelten und für anderes Material (Leber, Milz, Niere von Wirbeltieren, Verdauungsdrüsen der Wirbellosen etc.) entsprechend modifizirt werden müssen. Wir kommen also zu folgender Einteilung des Kapitels über die Darstellung der Peptidasen:

1. Aus den Verdauungsdrüsen der Wirbeltiere (Pankreas und Darmschleimhaut)

a) Trennung des tryptischen und ereptischen Anteils; b) Trennung der Peptidasen des Trypsinkomplexes; c) Trennung der Amino-polypeptidase und Dipeptidase.

2. Aus der Hefe.

3. Aus anderem Material

a) Organe der Wirbeltiere (Leber, Milz und Niere); b) Verdauungstrakt der Wirbellosen; c) Pilze und Bakterien; d) Höhere Pflanzen.

Bei der Darstellung des kristallisirten Trypsins von NORTHROP (s. § 521) vollzieht sich die Abtrennung der Peptidasen von selbst: Dieses Präparat enthält keine Peptidasen.

1) Aus den Verdauungsdrüsen der Wirbeltiere.

a) Trennung des tryptischen und ereptischen Anteils.

Erepsin und Trypsin des Pankreas können nach WALDSCHMIDT-LEITZ und HARTENECK 161) nach der WILLSTÄTTER'schen Methode der Adsorption und Elution getrennt werden, da das Trypsin basische Eigenschaften hat und daher von dem sauren Adsorbens Kaolin adsorbirt wird, Erepsin aber nicht; umgekehrt wird Erepsin von der eher basischen Tonerde adsorbirt.

Die Enzymlösung wird ebenso wie aus dem Darm (s. weiter unten) durch Extraktion der frischen oder getrockneten Drüse mit Glycerin gewonnen, und aus dieser nach Verdünnen mit Wasser das Erepsin bei ph = 4,7 (nach ABDERHALDEN und SCHWAB, l. c. 172, ph = 5,3) mit Tonerde $C\gamma$ adsorbirt. Bei höherem ph werden nach WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR (l. c. 167), sowie ABDERHALDEN c.s. 162) auch Carboxy-polypeptidasen mit adsorbirt. Zur Trennung von Trypsin ist eine mehrmalige (dreifache) Adsorption und Elution erforderlich. Die Elution wird mit 0,04 n-Ammoniaklösung oder auch (weniger gut) mit alkalischer Phosphatlösung von ph = 8,2 vorgenommen. Neutrale Phosphatlösungen eignen sich nicht. Bei dieser Trennung vom Trypsin findet gleichzeitig eine Anreicherung des Erepsins statt (161). Der tryptische Anteil enthält nach WALDSCHMIDT-LEITZ 163) außer der Proteinase die Carboxy-polypeptidasen incl. der Protaminase, sowie die Enterokinase. Zur Gewinnung enterokinase-freien Trypsins wird die Kinase zuvor nach WALDSCHMIDT-LEITZ und LINDERSTRØM-LANG 164) durch

160) ***S. Otani***, Über die Sulfopeptidase, I, II. Acta Scholae med. Kioto, **17**, 163, 170 (1934); BPh 85, 165. — 160a) ***E. Abderhalden, E. von Ehrenwall***, Z. Frage der Einheitl. des Erepsins. Fermentforsch., **12**, 223 (1930). S.A. — 161) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck***, Die trypt. und erept. Wirk. d. Pankreasdrüse. Zs. phys. Chem., **147**, 286 (1925). — 162) ***E. Abderhalden c.s.***, Z. Frage d. Einheitl. d. Trypsinkomplexes. Fermentforsch., **10**, 478, 481 (1929). — 163) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.***, Struktur der Protamine. Zs. phys. Chem., **197**, 219 (1931). — 164) ***E. Waldschmidt-Leitz, K. Linderstrøm-Lang***, Darst. von enterokinasefreiem Trypsin. Zs. phys. Chem., **166**, 241 (1927). S.A.

Ausfällen von Casein in der Enzymlösung mit niedergeschlagen, wobei kaum Verluste an inaktivem Enzym (Proteinase und Carboxy-polypeptidasen) auftreten sollen; Näheres s. § 519.

Das am längsten bekannte Ausgangsmaterial zur Herstellung des Erepsins ist die Darmschleimhaut. Diese Gewinnung von Erepsin aus dem Schweinedarm ist von WALDSCHMIDT-LEITZ (H.W., Bd. III, S. 1026) ausführlich beschrieben. Sie gelingt durch Extraktion der Schleimhaut mit Glycerol und Fällung mit Alkohol (EULER und JOSEPHSON 165)).

Da das empfindliche Enzym jedoch (speciell die Dipeptidase, s. §§ 499, 500) durch Alkohol und auch die meisten anderen Fällungsmittel leicht geschädigt wird, ist es nach WALDSCHMIDT-LEITZ und SCHÄFFNER 166) günstiger, die Fällung mit Essigsäure vorzunehmen, wobei eine Reinigung ohne große Verluste an Aktivität erzielt wird. Die Trennung vom Trypsin erfolgt wie beim Pankreas durch Adsorption aus der überstehenden abzentrifugirten Lösung an Tonerde $C\gamma$ oder an Kaolin bei ph = 4,7 und nachfolgende Elution mit Phosphatlösung vom ph = 8,2, der zur Stabilisirung des Enzyms etwa 20 % Glycerol zugesetzt wird. Es genügt bereits eine einmalige Adsorption und Elution, um eine Lösung zu erhalten, die frei von Trypsin ist und etwa 80 % des Erepsins der Ausgangslösung enthält. Eine Konzentrations-steigerung des Erepsins wird durch die Adsorption an Tonerde nicht, an Kaolin kaum erzielt.

b) Trennung der Peptidasen des Trypsinkomplexes.

Die Aufteilung des „Pankreastrypsins" in Carboxy-polypeptidasen einerseits und Tryptase + Protaminase andererseits gelingt nach WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR 167) durch Adsorption an Tonerde $C\gamma$ bei neutraler Reaktion (ph = 7).

Hierbei gehen die Carboxy-polypeptidasen an das Adsorbens, aus dem sie mit verdünnter (0,04 n-)NH_4OH-Lösung (mit etwa 20 % Glycerol) mit mäßiger Ausbeute, aber frei von Proteinase eluirt werden können, während die Proteinase und Protaminase in der Adsorptionsrestlösung verbleiben. Andere Adsorbentia wie $Fe(OH)_3$, $Be(OH)_2$ oder andere Tonerdesorten sind zur Trennung ungeeignet (167). Nach ABDERHALDEN 168) verbleibt bei diesem Verfahren jedoch noch ein Teil der polypeptidspaltenden Wirkung in der Adsorptionsrestlösung. Die vollständige Abtrennung der Proteinase gelingt nach ABDERHALDEN 168) durch Adsorption an Eisenoxyd-gel und zwar, je nach dem angewandten Eisenpräparat, bei ph = 3,6 oder 4,6, wobei sämtliche Peptidasen adsorbirt werden.

Die Abtrennung der Protaminase erfolgt nach WEIL 169) durch deren Adsorption an Tonerde A bei ph = 7 nach Entfernung der Carboxy-polypeptidasen, da diese sonst von Tonerde A mit adsorbirt werden. Auf solche Weise wird aber nur protaminase-freie Proteinase erhalten und nicht umgekehrt. Zur Darstellung reiner Protaminase wird nach Abtrennung der Carboxy-polypeptidasen durch Tonerde $C\gamma$ bei ph = 7 die tryptische Proteinase nach WALDSCHMIDT-LEITZ 170) durch Zusatz von 1 % Eieralbumin adsorbirt und mit diesem durch Aceton bei einem Acetongehalt der Lösung von 37 % abgeschieden. Nach Verjagen des Acetons durch Hindurchleiten von Luft wird auf diesem Wege reine Protaminaselösung erhalten, während WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 152) ursprünglich keine Abtrennung der Protaminase vornehmen und deren Wirkung nur dadurch studiren konnte, daß die begleitende Proteinase durch Eieralbumin inaktivirt wurde, so daß die Protaminase allein wirken konnte.

Kristallisirte Carboxy-polypeptidase ist von ANSON 171) dargestellt worden. Es handelt sich um Globulin-kristalle, die eine hohe Aktivität gegen Chloracetyl-tyrosin besitzen. Da weitere Substrate noch nicht geprüft sind, ist noch nicht entschieden, ob es sich um ein Teilenzym der „Carboxy-polypeptidasen" handelt. Die Kristalle wurden folgendermaßen dargestellt:

165) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Enz. Spalt. v. Dipeptiden, I. Ber. Chem. Ges., **59**, 226 (1926). — 166) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner,*** Z. K. des Darmerepsins. Zs. phys. Chem., **151**, 31 (44) (1926). — 167) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Proteinase und Carboxypolypeptidase aus Pankreas. Ber. Chem. Ges., **62**, 2217 (1929). — 168) ***E. Abderhalden, J. Heumann,*** Adsorptions-Affinität der im Ferm.-komplex Trypsin enthaltenen Anteile etc. Fermentforsch., **12**, 572 (1930/1). S.A. — 169) ***L. Weil,*** Prep. of enzymat. pure proteinase and the quant. determ. of the infl. of protaminase. Jl. of Biol. Chem., **105**, 291 (1934). — 170) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Kofranyi,*** Darst. v. Protaminase. Zs. phys. Chem., **222**, 148 (1933). S.A. — 171) ***A. L. Anson,*** Crystalline carboxy-polypep. Science (N. Y.), **81**, 467 (1935). S.A.

Die beim Stehen von gefrorenem Rinderpankreas über Nacht bei 5° austretende trübe Flüssigkeit wird mit 5n-Essigsäure versetzt, bis Grünfärbung mit Bromkresol auftritt. Nach zweistündigem Stehen der sauren Flüssigkeit wird der Niederschlag abfiltrirt und die überstehende Lösung mit der zehnfachen Wassermenge versetzt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltrirt und gibt bei Suspension in Wasser eine zweimal so aktive Carboxy-polypeptidase-lösung wie der rohe Extrakt. Durch Zusatz von 0,2 mol-$Ba(OH)_2$ bis zur Rosafärbung gegen Phenolphthalein wird ein Teil des Proteins mit der gesamten Carboxy-polypeptidase gelöst und abzentrifugirt. Nach Versetzen mit 1n-Essigsäure bis zur Orangefärbung gegen Phenolrot kristallisirt die Carboxy-polypeptidase aus, die durch Auflösen in NaOH und darauffolgende Neutralisation umkristallisirt und so ohne Aktivitätsverlust von den Resten der Proteinase befreit werden kann.

Eine weitere Aufteilung des Trypsinkomplexes unter Abtrennung verschiedener Carboxy-polypeptidasen ist von ABDERHALDEN und SCHWAB **172)** vorgenommen worden. Zu diesem Zweck wurde die Restlösung von der Erepsinadsorption bei ph = 5,3 viermal mit „LLOYD's Alkaloid-reagens" versetzt, wobei die Tyrosin-polypeptidase und kleine Mengen Leucin-polypeptidase und Acylase adsorbirt werden. Die letzteren werden durch Elution mit verdünntem Ammoniak entfernt und die Tyrosin-polypeptidase durch Elution mit Tyrosin, Gallussäure oder 3,4-Dioxyphenylalanin erhalten. Die Restlösung enthält die Proteinase und die Leucin-polypeptidase, die durch erneute Adsorption an LLOYD's Alkaloid-reagens entfernt werden kann. Durch direkte Behandlung des Pankreasextraktes oder des Rohtrypsins mit LLOYD's Alkaloid-reagens bei ph = 4,7 und Elution mit Phosphatlösungen sollen noch weitere Fraktionen dieser Enzyme abgetrennt werden können.

Die Acylase kann aus der Adsorptionsrestlösung des Erepsins nach ABDERHALDEN c.s. (l. c. 162) durch Tonerde $C\gamma$ bei ph = 5,6 adsorbirt und nach Waschen des Adsorbats mit Glycerin durch Ammoniak eluirt werden. Das Eluat wird gleich nach dem Abzentrifugiren filtrirt und dann neutralisirt.

Ein ähnliches Enzym, das Chloracetyl-o-nitranilin spaltet, aber von tryptischer und katheptischer Carboxy-polypeptidase verschieden ist (s. a. § 502), erhielten BALLS und KÖHLER **173)** aus der Restlösung nach dreimaliger Tonerde-adsorption des Erepsins durch Adsorption an Tonerde $C\gamma$ bei ph = 7,0 und Elution mit secundärem Phosphat; die ereptischen Enzyme werden mit H_2S oder HCN abgetötet. Das Ferment ist nach ABDERHALDEN c.s. (l. c. 131) verschieden von der chloracetyl-l-alanin-spaltenden Acylase und wird auch bei ph = 5,0 adsorbirt, ist dann aber nicht frei von Proteinase.

c) Trennung der Amino-polypeptidase und der Dipeptidase.

Beide Peptidasen werden von Tonerde $C\gamma$ etwa gleichmäßig adsorbirt und demgemäß gemeinsam als „Erepsin" gewonnen. Aus diesem Gemisch können sie nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **174)** durch ihre verschiedene Adsorbirbarkeit an $Fe(OH)_3$ isolirt werden. Rotes Eisenhydroxyd adsorbirt aus saurer Lösung (ph = 3,8) die Dipeptidase stark, die Amino-polypeptidase jedoch nur wenig.

Nach dreimaliger Adsorption hinterbleibt in der Lösung nur die Polypeptidase. Dipeptidase wird aus dem Adsorbat mit 1 %iger Na_2HPO_4-Lösung eluirt; die Elution ist aber noch nicht frei von Polypeptidase. Stärker als durch ihre Adsorption an das gefällte rote Hydroxyd unterscheiden sich die beiden Peptidasen durch ihr Adsorptionsverhalten gegen Hämatit oder gelbes Eisenhydroxyd ($Fe_2O_3 \cdot H_2O$) (s. auch § 499). WALDSCHMIDT-LEITZ und BALLS **175)** empfehlen daher, die Trennung mit gealtertem rotem Eisenhydroxyd einzuleiten und sie dann bei ph = 4 mit Hämatit oder gelbem Hydroxyd zu vervollkommnen. Die Ausbeute an Dipeptidase ist auch hier nicht sehr gut, jedoch

---

172) ***E. Abderhalden, E. Schwab,*** Z. Problem der specif. Einst. der Polypeptid. Fermentforsch., **12**, 432, 559 (1931). S.A. — 173) ***A. K. Balls, F. Köhler,*** Eine neue proteol. Wirk. von Darmschleimhaut-Auszügen. Ber. Chem. Ges., **64**, 383 (1931). — 174) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls, J. Waldschmidt-Graser,*** Über Dipept. und Polypept. aus Darmschleimhaut. Ber. Chem. Ges., **62**, 956 (1929). — 175) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls,*** Z. K. der Amino-polypept. aus Darmschleimhaut. Ber. Chem. Ges., **63**, 1203 (1209) (1930). S.A.

ist sie frei von Amino-polypeptidase und die Adsorptions-restlösung enthält nach BALLS und KÖHLER 176) fast die gesamte ursprünglich vorhandene Amino-polypeptidasenmenge ohne jede Dipeptidase. Auch Eisenphosphat ist hierfür geeignet (177).

Die Amino-polypeptidase kann nach BALLS und KÖHLER 176) durch Fällen mit gekühltem Aceton bei — 5° bis — 10°, Filtriren durch Kieselgur und Suspension des Rückstandes in 20 %igem Glycerin zur Ablösung des Enzyms vom Kieselgur noch weitgehend gereinigt werden, wodurch nicht nur die gesamte Dipeptidase, sondern auch das chloracetyl-nitranilinspaltende Ferment vollkommen abgetrennt werden kann (178). Nach ABDERHALDEN 179) enthält diese Lösung jedoch noch geringe Mengen Dipeptidase und natürlich auch fast die gesamte Prolylpeptidase: die letztere kann aber, ohne die Amino-polypeptidase wesentlich zu schädigen, durch Einwirkung von H_2S inaktivirt werden, wobei gleichzeitig die restliche Dipeptidase unwirksam gemacht wird.

Nicht abgetrennt wurde bisher die Prolylpeptidase von GRASSMANN 180), wenn auch bei Elution des „Erepsin-Adsorbats" aus der Tonerde $C\gamma$ mit einer NH_3- und glycerinhaltigen Diammonphosphatlösung von ph = 8,7 eine Anreicherung gegenüber den beiden anderen Enzymen erfolgt. Sehr reine Trockenpräparate von Prolylpeptidase konnten durch Fällung konzentrirter Glycerinextrakte aus Lunge mit Aceton, Alkohol oder Äther nach schwachem Ansäuern mit Essigsäure erhalten werden.

LINDERSTRØM-LANG (l. c. 235) will auch eine teilweise Trennung der beiden Dipeptidasen (s. §§ 499, 502) der Darmschleimhaut durch Adsorption und Elution erreicht haben.

2) Aus der Hefe.

Anders als Pankreastrypsin wird das sogenannte „Hefetrypsin" durch Tonerde (A oder C) relativ leicht adsorbirt und kann so von der Dipeptidase der Hefe getrennt werden. Hierbei gehen jedoch sämtliche Polypeptidasen mit dem Trypsin an das Adsorbens. Diese Trennung des Hefeautolyse-saftes in „Trypsin" und Polypeptidasen einerseits und Dipeptidase andererseits ist von GRASSMANN (H.W. Bd. III, S. 997 u. ff.) ausführlich beschrieben worden.

Abweichend von der dort gegebenen Vorschrift empfiehlt es sich nach GRASSMANN 181) zur Erzielung reiner Präparate stets 1 bis 1½ Stunden nach Versuchsbeginn eine (enzymfreie) Vorfraktion des Autolysats mit etwa 25 % der Hefetrockensubstanz abzutrennen und zu verwerfen.

Durch 5malige Adsorption mit Tonerde gelingt nach WILLSTÄTTER und GRASSMANN 182) die Abtrennung des gesamten „Trypsins", wenn nach kurzer Neutralautolyse der mit Essigester abgetöteten Hefe das Hefe-autolysat mit Essigsäure und Acetatpuffer auf ph = 5,0 gebracht wird. Jedoch geht hierbei auch ein erheblicher Teil der Dipeptidase mit an das Adsorbens, so daß also nur etwa die Hälfte des ursprünglich vorhandenen Enzyms in der reinen Dipeptidaselösung wiedergefunden wird.

Bei Verwendung ganz frischer Autolysate (24—30 Stunden bei ph = 6,5—7), und von verdünnten Lösungen wird das „Trypsin" nach GRASSMANN und HAAG 183) durch Tonerde A gut, die Dipep-

---

176) ***A. K. Balls, F. Köhler,*** Über den Mechanism. d. enzymat. Dipeptid-spalt. Ber. Chem. Ges., **64**, 34, 294 (1931). — 177) ***A. K. Balls, F. Köhler,*** Über Amino-polypept. Zs. phys. Chem., **219**, 128 (1933). S.A. — 178) ***A. K. Balls, F. Köhler,*** Über Amino-polypept. Zs. phys. Chem., **205**, 157 (1932). S.A. — 179) ***E. Abderhalden, R. Merkel,*** Über das Vorhandens. einer Prolinase. Fermentforsch., **15**, 1 (7, 11, 14, 16) (1936). S.A. — 180) ***W. Graßmann, O. v. Schoenebeck, G. Auerbach,*** Die enzymat. Spaltbark. der Prolinpept., II. Zs. phys. Chem., **210**, 1 (9) (1932). S.A. — 181) ***W. Graßmann,*** Trennung der Hefeproteasen. Hb. biol. Arbeitsmeth. von E. ABDERHALDEN, IV. Abtl., Teil 1, Berlin-Wien 1936, S. 799, 810. — 182) ***R. Willstätter, W. Graßmann,*** Über die Proteasen der Hefe. Zs. phys. Chem., **158**, 250 (278) (1926). — 183) ***W. Graßmann, W. Haag,*** Adsorptionsverh. und Trennung der Hefeproteasen. Zs. phys. Chem., **167**, 188 (1927).

tidase fast garnicht adsorbirt, besonders wenn die Tonerde mit Hefe-autolysat „vorbehandelt" ist, da die Dipeptidase durch Begleitstoffe aus der Adsorption verdrängt wird (181) (vgl. auch § 499). Kaolin adsorbirt schlechter, aber das Mengenverhältnis der beiden Enzyme bleibt das gleiche (183).

Das „Trypsin" wird am besten durch Diammonphosphat eluirt, nochmals adsorbirt und dann durch NH_4OH eluirt, wobei der Rest der Dipeptidase zerstört wird (GRASSMANN c.s. 183), 184)). Vollständig reine Dipeptidase, die auch keine Prolylpeptidase mehr enthält, läßt sich nach ABDERHALDEN (l. c. 179, S. 14) besser durch dreimalige Adsorption der übrigen Enzyme mit Tonerde $C\gamma$ erhalten.

Wie bereits § 497 erwähnt, läßt sich die Abtrennung der Proteinase und Polypeptidasen besser als durch Adsorption durch eine fraktionirte Autolyse der Hefe durchführen.

Hierbei hat man es nach GRASSMANN 181) in der Hand, durch geeignete Wahl des Zellgiftes und der Acidität, die Freilegung des einen Enzyms zu fördern und des anderen zu unterdrücken. Zur Gewinnung des „Hefetrypsins", also Proteinase + Amino-Polypeptidase, verfahren GRASSMANN und DYCKERHOFF 185) folgendermaßen.

Frische Hefe wird mit $CHCl_3$ verflüssigt und nach Zusatz von Wasser und Toluol mit 10 %igem NH_4OH deutlich alkalisch gemacht; die alkalische Reaktion muß durch erneute Ammoniak-zusätze während der Autolyse erhalten bleiben. Dann enthält die nach 48 Stunden abgetrennte Enzymlösung keine Dipeptidase mehr. Zur Reinigung von Begleitstoffen werden die Proteinase und Aminopolypeptidase mit 2,5 n-Essigsäure gefällt. Bei dieser Fällung wird nur ein geringer Teil des Invertins der Hefe mitgerissen; diese kleine adsorbirte Invertinmenge läßt sich durch wiederholtes Auswaschen mit verdünnter Essigsäure vollkommen entfernen, so daß auf diesem Wege auch vollkommen invertinfreie Proteasenpräparate erhalten werden. Aus dem abzentrifugirten Niederschlag werden die Enzyme mit verdünntem Ammoniak eluirt und 68 Stunden gegen fließendes Leitungswasser und dann 40 Stunden gegen fließendes destillirtes Wasser in einer Fischblase dialysirt. Hierbei bleibt die tryptische Wirksamkeit erhalten, während die der Polypeptidase (gegen Leucyl-diglycin) um etwa 40 % abnimmt. Bei kürzerer Dialysendauer und genauer Bemessung der Ammoniakmenge bei der Autolyse können wirksamere Präparate erhalten werden. Z.B. gewannen GRASSMANN c.s. durch 20stündige Dialyse ein Präparat, von dem 0,04 cm^3 (mit einem Trockengewicht von 0,36 mg) 49 mg Leucyl-diglycin in 1^h unter den üblichen Bedingungen zu 75 % spaltete.

Die Abtrennung der Amino-polypeptidase von der Proteinase der Hefe beruht nach GRASSMANN (l. c. 154) 181) auf der erheblich leichteren Freilegung der Proteinase als der Polypeptidase aus den Hefezellen (s. auch Schema II, § 497).

Nach 24 Stunden, spätestens aber nach 48 Stunden ist nach GRASSMANN und DYCKERHOFF 186) die gesamte Proteinase in Lösung gegangen, während sich im Heferückstand noch der größte Teil der Polypeptidase befindet. Wird daher nach dieser Zeit der Rückstand abgetrennt, mit H_2O gewaschen und dann erneut mit Wasser und Zellgift der Autolyse überlassen, so erhält man nach einigen Tagen eine proteinase-freie Lösung der Polypeptidase, die über 30 % der ursprünglichen Peptidasenmenge enthält. Reinheitsgrad und Ausbeute werden nach GRASSMANN 187) bis auf das Zehnfache erhöht, wenn während dieser Autolyse der Hefe Papain zugesetzt wird. Die Amino-polypeptidase kann weiter gereinigt werden durch vorsichtiges Ausfällen mit Essigsäure, Auflösen des Niederschlages mit etwas Ammoniak, Fällung der Nucleinsäure durch Natriumacetat und weiterer Ballaststoffe durch Ammoniumsulfat und schließlich Dialyse. Die Reinheit steigt dabei von PoW. = 33 auf PoW. = 450 (Definition von PoW. s. § 501).

Bei der Darstellung von Trockenpräparaten vermindert sich die Aktivität der Aminopolypeptidase unter Umständen sehr erheblich. Gut wirksame Trockenpräparate können nach

---

184) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff,*** Über die Specif. der Hefe-Pept. Ber. Chem. Ges., **61**, 656 (1928). — 185) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff,*** Wirkungsw. der Hefepolypept. Zs. phys. Chem., **175**, 18 (24) (1928). S.A. — 186) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff,*** Die Proteinase und die Polypept. der Hefe. Zs. phys. Chem., **179**, 41 (47) (1928). — 187) ***W. Graßmann, L. Emden, H. Schneller,*** Amino-polypept. aus Hefe. Bioch. Zs., **271**, 216 (1934).

GRASSMANN 185) gewonnen werden, wenn die stark eingeengten Lösungen (im Vakuum eingedampft) in einen großen Acetonüberschuß, der auf — 15° bis — 20° vorgekühlt war, eingegossen werden und der sofort abzentrifugirte Niederschlag mit Aceton und Äther sorgfältig getrocknet wird.

Zur Gewinnung von Dipeptidase nach dem Autolyse-verfahren ist es nach GRASSMANN 181) erforderlich, die Hefe durch Essigester oder Toluol abzutöten und zu verflüssigen, sowie die Autolyse bei neutraler Reaktion vorzunehmen, da Chloroform die Dipeptidase schädigt und diese außerdem in alkalischer Lösung sehr unbeständig ist.

Zur Darstellung der Dipeptidase ist jedoch das eben beschriebene Verfahren der fraktionirten Autolyse, wie ja klar auf der Hand liegt, nicht geeignet. Zur ihrer Gewinnung bedient man sich daher der oben beschriebenen Adsorptions-methode, bei der die reine Dipeptidase in der Restlösung erhalten wird. Vollständig frei von Amino-polypeptidase gewinnt man sie nach GRASSMANN und KLENK 188) als Trockenpräparat, da bei der fraktionirten Ausfällung mit Aceton bei ph = 7 zunächst die Reste der Amino-polypeptidase mit ausgefällt werden, während die späteren Fraktionen ganz rein sind. Die Fällung muß aber möglichst rasch und bei möglichst tiefer Temperatur erfolgen, um gut wirksame Präparate zu erhalten.

Englische Hefen verhalten sich nach MACRAE **190a)** etwas anders bei der Autolyse und gegenüber Adsorptionsmitteln als die Löwenbräuhefe, mit der die Untersuchungen von GRASSMANN c.s. angestellt wurden; nach geringer Modifikation des Verfahrens konnte MACRAE jedoch gleichfalls sehr wirkungsreine Praeparate von Dipeptidase und Amino-polypeptidase erhalten.

3) Aus anderem Material.

a) Organe der Wirbeltiere.

In seiner Zusammensetzung ist das Proteasensystem von **Leber und Milz** der Wirbeltiere nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 148) ähnlich dem der Hefe. Jedoch ähnelt das Adsorptionsverhalten dieses Enzymsystems nach GRASSMANN **189)** dem des Pankreas.

Daher kann auch hier das Gemisch von Dipeptidase und Amino-polypeptidase durch Adsorption an Tonerde Cγ abgetrennt und dann, wie oben beschrieben, weiter zerlegt werden. Die Adsorption der ereptischen Enzyme wird am besten nach vorheriger Entfernung der Zookinase durch Kaolin bei ph = 4,0 durch Tonerde Cγ bei demselben ph vorgenommen. Die Elution erfolgt mit 0,04n-NH_4OH (enthaltend 25 % Glycerol). Die Lösung dieses „Lienoerepsins" ist frei von katheptischer Wirkung (l. c. 148).

Da jedoch die Menge der katheptischen Enzyme in diesen Organen gering gegen die der ereptischen ist, so gelingt nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **190)** (l. c. 148) die Abtrennung der ereptischen Enzyme nicht vollständig und es verbleiben stets noch geringe Mengen von ihnen in der Adsorptions-restlösung neben der katheptischen Proteinase und Carboxy-polypeptidase. sie können aber in der Lösung durch Gifte (wie HCN, H_2S oder $HgCl_2$), durch welche die katheptischen Enzyme nicht gehemmt werden, irreversibel zerstört werden, während andererseits die katheptischen Enzyme besonders durch HCN und H_2S sogar aktivirt werden, so daß auf diese Weise eine reine Lösung der katheptischen Enzyme, frei von ereptischer Wirkung, erhalten wird.

Die katheptische Carboxy-polypeptidase kann von der Proteinase durch Adsorption an Kaolin aus saurer Lösung abgetrennt werden; es gelingt aber hierbei nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 148, S. 37) auch wieder nur die Reindarstellung der Proteinase frei von Carboxy-polypeptidase und nicht umgekehrt, da sich die Carboxy-polypeptidase in ihrem Adsorptionsverhalten nur im sauren Gebiet, in dem ihre Beständigkeit bereits sehr gering ist, von dem der Proteinase (und auch hier nur gering) unterscheidet. Durch mehrmalige Adsorption an Eisenhydroxyd-Gel bei ph = 3,8 kann so die gesamte Carboxy-polypeptidase entfernt und eine reine

188) ***W. Graßmann, L. Klenk,*** Z. Frage der Einheitl. tier.- und pflanzl. Dipept. Zs. phys. Chem., **186**, 26 (36) (1930). S.A. — 189) ***W. Graßmann,*** Proteasen. Hb. d. Biochemie d. Mensch. u. d. Tiere, 2. Aufl., Erg. Bd., G. FISCHER, Jena 1930, S. 175 (199). — 190) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Deutsch,*** Die proteol. Enz. der Milz. Zs. phys. Chem., **167**, 285 (1927). — 190a) ***T. F. Macrae,*** Proteol. enz. of yeast. Biochem. Jl., **27**, 1227 (1933).

Proteinasenlösung in mäßiger Ausbeute erhalten werden. Bei der alkalischen Elution des Adsorbats wird jedoch neben der Carboxy-polypeptidase auch die mit adsorbirte Proteinase eluirt, so daß also eine reine Carboxy-polypeptidasen-lösung bisher noch nicht gewonnen wurde.

Aus der **Niere** können die Peptidasen mit 70 %igem Glycerin extrahirt werden; in diesem, nicht aber in wäßrigem Extrakt sind die Enzyme, besonders aber die Dipeptidase nach GRASSMANN (l. c. 188) ziemlich stabil.

Die Trennung von Amino- und Carboxy-polypeptidasen konnte ABDERHALDEN **191)** *) durch fraktionirte Acetonfällung erreichen, wobei jeweilig in verschiedenen Fällungen Anreicherung des einen und Verarmung oder gar vollständiges Fehlen des anderen Enzyms festgestellt wurde.

Die **Sulfopeptidase** wird nach S. OTANI **192)** bei ph = 3,3—4,1 aus dem Glycerinextrakt der Niere nahezu quantitativ an Kieselgur adsorbirt und hieraus durch Phosphatlösung vom ph = 7,5 in guter Ausbeute wieder eluirt.

b) Verdauungstrakt der Wirbellosen.

Die Proteasen des Verdauungstraktes (Magensaft und Mitteldarmdrüse) von *Maja squinado latr.* zeigen nach MANSOUR-BEK **193)** eine erhebliche Ähnlichkeit in ihrem Adsorptionsverhalten mit dem Proteasensystem der Hefe.

Bei der adsorptiven Trennung der 4 Enzyme: Proteinase, (tryptische) Carboxy-polypeptidase, Amino-polypeptidase und Dipeptidase aus dem Extrakt der Mitteldarmdrüse, werden Carboxy-polypeptidase und Dipeptidase zusammen bei ph = 4 an Kaolin adsorbirt; sie können durch 4malige Adsorption vollkommen von der Restlösung abgetrennt werden, in der nur Proteinase und Amino-polypeptidase verbleiben. Durch 4maliges Behandeln dieser Restlösung mit $Fe(OH)_3$ bei ph = 7 wird auch die Amino-polypeptidase abgetrennt und die Proteinase in einer Ausbeute von 30 % rein erhalten. Die Amino-polypeptidase wird aus den vereinigten Adsorbaten der Eisenhydroxyd-adsorption nach deren einmaligem Waschen mit 30 %igem Glycerolwasser von ph = 7 durch Elution mit n/20 Essigsäure gewonnen. Die Elution enthält die Amino-polypeptidase in 28 %iger Ausbeute, sowie noch 2 % der Proteinase.

Zur Darstellung der Carboxy-polypeptidase, die stark von Kaolin adsorbirt wird, werden die vereinigten Kaolin-adsorbate nach einmaligem Waschen mit 30 %igem Glycerolwasser vom ph = 4 mit $2^3/_3$ Ammonphosphat eluirt.

Zur weiteren Reinigung wird die Elution mit Tonerde bei ph = 8 versetzt und das Adsorbat nach Waschen mit 30 %igem Glycerinwasser von ph = 8 mit n/20 Essigsäure eluirt. Die Elution enthält 60 % der Carboxy-polypeptidase und ist frei von jeder anderen Wirkung. Die Dipeptidase ist außerordentlich unbeständig und kann daher nicht rein erhalten werden.

Ganz anders wieder ist das Adsorptions-verhalten im Enzymsystem der Verdauungsdrüsen des Gastropoden *Murex anguliferus Lamk.* Aus dem Glycerinextrakt der Verdauungsdrüsen werden nach MANSOUR-BEK **194)** die Proteinase, die Carboxy-polypeptidase und die Dipeptidase zusammen an Kaolin bei saurer Reaktion (ph = 4) adsorbirt und so gut von der Amino-polypeptidase getrennt. Nach 4maliger Adsorption mit Kaolin und einmaliger mit Eisenhydroxyd-suspension verbleibt die Amino-polypeptidase in der Restlösung mit 58 %iger Ausbeute. Die vereinigten Kaolin-adsorbate werden nach einmaligem Waschen mit 30 %igem

---

*) Fermentforsch. **13**, 548 Fußnote 1 (1933) gibt ABDERHALDEN an, daß auf die hier beschriebene Weise in der citirten Arbeit **(191)** eine Trennung von „*Polypeptidase und Acylase aus Organpreßsaft (Leber und Milz) glückte*".

191) ***E. Abderhalden, O. Herrmann,*** Vers. durch frakt. Fällung m. Aceton aus Orangepreßsäften Polypept. mit specif. Wirk. abzuscheiden. Fermentforsch., **11,** 267 (1930). S.A. — 192) ***Sh. Otani,*** Über die Sulfopept., II. Acta Scholae med. Kioto, **17,** 170 (1934); BPh **85,** 165. — 193) ***J. J. Mansour-Bek,*** Die proteol. Enz. von Maja squinado Latr. Zs. vergl. Phys., **17,** 153 (168, 187) (1932). S.A. — 194) ***Ders.,*** Die proteol. Enz. von Murex anguliferus Lamk. ibid. **20,** 343 (361, 362) (1934). S.A.

Glycerinwasser von ph = 4 mit 0,6 %iger $2^2/_3$ Ammonphosphat-lösung eluirt und aus der Elution die Carboxy-polypeptidase wie oben bei ph = 8 mit Tonerde adsorbirt; aus dem Adsorbat wird sie durch Elution mit Essigsäure in 85 %iger Ausbeute rein erhalten. Die Proteinase verbleibt (mit geringen Mengen Amino-polypeptidase) in der Restlösung von der Tonerde-adsorption mit 50 %iger Ausbeute. Die Dipeptidase geht auch hier wegen ihrer Unbeständigkeit im Verlaufe der Trennung verloren.

Bei *Periplaneta americana* konnte WIGGLESWORTH **195)** auf die gleiche Weise wie WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 131) bei Pankreas wenigstens eine teilweise Trennung von Trypsin und Erepsin erzielen. Die gleiche Trennung führte YONGE **196)** in Extrakten der Mesenterialfilamente von *Lobophyllia* durch.

c) Pilze und Bakterien.

Aus *Aspergillus parasiticus* erhielten JOHNSON und PETERSON **197)** reine Amino-polypeptidase.

Aus den auf entrahmter Milch + 5 % Glucose bei 30° gezüchteten Pilzen wird ein wäßriger Extrakt (ph = 7) hergestellt, aus dem die Enzyme (Proteinase, Carboxy-polypeptidase, Amino-polypeptidase, Dipeptidase) durch Aceton gefällt und dann mit Ultrafiltration gereinigt werden. Durch Alkohol wird aus dem Ultrafiltrat die Amino-polypeptidase und ein Teil der Dipeptidase gefällt und die Amino-polypeptidase durch Adsorption an Tonerde $C\gamma$ und Eisenhydroxyd in bekannter Weise noch weiter gereinigt.

Aus *Aspergillus niger* stellt H. OTANI **198)** eine Sulfopeptidase dar, die allerdings noch mit Dipeptidase vermischt ist.

Aus dem unverdünnten, mit Glycerin hergestellten Macerationssaft der Pilze fallen beim Ansäuern auf ph = 5 die übrigen Proteasen zusammen mit den Begleitstoffen aus, so daß eine ziemlich reine Lösung von Sulfopeptidase und Dipeptidase hinterbleibt; eine weitere Trennung durch Adsorption konnte jedoch bisher nicht erzielt werden.

Im **Malzextrakt** können die Proteinase und Peptidasen nach LINDERSTRØM-LANG **199)** durch ein kombinirtes Verfahren der Autolyse und Adsorption-Elution voneinander getrennt werden.

Peptidasefreie Proteinase-lösungen werden erhalten durch längeres Stehenlassen der dialysirten wäßrigen Malzextrakt-lösung bei 1° oder kürzeres Stehenlassen bei höherer Temperatur mit Toluol; nach HOPKINS **200)** bei ph = 4,6 und 40°. Proteinasefreie Peptidasenlösungen gewinnen LINDERSTRØM-LANG und SATO **199) 199a)** durch Adsorption der Proteinase mit Eisenhydroxyd aus 44 %iger Glycerinlösung von ph = ca. 8; die von Proteinase befreite Restlösung der Peptidasen bleibt nach Zusatz von Toluol bei 1° längere Zeit stabil.

Abtrennungsversuche der ereptischen Enzyme (Dipeptidase) von der katheptischen Proteinase (und Carboxy-polypeptidase) führte AMBROS **200a)** in verschiedenen **Pflanzensäften** durch. Die Proteinase wurde durch Adsorption und Elution von der Dipeptidase befreit, während die letztere in den Restlösungen etwas angereichert wurde.

---

195) ***V. B. Wigglesworth,*** Dig. in the cockroach. Biochem. Jl., **22,** 150 (156) (1928). — 196) ***C. M. Yonge,*** Stud. on the physiol. of Corals. Brit. Mus. Nat. Hist., Great Bowier Reef Exped. 1928/29 Sci. Rep., **1,** Nr. 3, S. 59 (1930); cit. n. P. KRÜGER, Ergebn. Phys. exp. Pharm., **35,** 538 (1933). S.A. — 197) ***M. J. Johnson, W. H. Peterson,*** Peptidase system of aspergillus parasiticus. Jl. of Biol. Chem., **112,** 25 (1935). — 198) ***H. Otani,*** Über die Sulfopept. der Pilze II. Acta Scholae med. Kioto, **17,** 249 (1934); BPh **85,** 416. — 199) ***K. Linderstrøm-Lang, M. Sato,*** On the determ. and sep. of the proteol. enz. in green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **17,** Nr. 17, S. 32 (1929). S.A. — 199a) ***M. Sato,*** Invest. of the proteol. enz. of green malt. Mem. Fac. Sci. Taihoku imp. Univ., **9,** Nr. 2, (1934). S.A. — 200) ***R. H. Hopkins, J. A. Burns,*** The proteol. enz. of green malt. Jl. of the Inst. of Brewing **36,** 9 (12) (1930). — 200a) ***O. Ambros, A. Harteneck,*** Über die Proteasen höherer Pflanzen. Zs. phys. Chem., **184,** 93 (104) (1929).

III. Eigenschaften.

1) Stabilität, elektrisches und chemisches Verhalten.

§ 499. Wenn wir auch heute nicht mehr den resignirten Standpunkt des H.W. einzunehmen brauchen, daß durch die noch nicht erzielte Reindarstellung nichts über die Eigenschaften der Peptidasen ausgesagt werden kann, so verfügen wir doch auch noch nicht oder doch nur in seltenen Fällen über so reine Präparate der einzelnen Ferment-individuen, daß die Eigenschaften jedes „reinen Fermentes" (gleich welcher Herkunft) absolut konstant sind, wie die reiner chemischer Verbindungen. Dies gilt insbesondere für die Stabilität und das Adsorptionsverhalten, die noch weitgehend von nicht vollständig abtrennbaren Begleitstoffen beeinflußt werden.

So ist z. B. „Magen-erepsin" ebenso wie „Pankreas-erepsin" erheblich beständiger als „Darm-erepsin" und verliert nach WILLSTÄTTER und BAMANN (l. c. 146) seine Aktivität auch beim Trocknen der Mucosa nicht. Derartige Angaben haben also für die Eigenschaften der Enzyme selbst wenig Bedeutung und wir werden uns im folgenden auf die Angaben über die Eigenschaften mehr oder weniger gereinigter Fermentlösungen beschränken.

a) Stabilität.

Im H.W. wurde festgestellt, daß die Stabilität der „Peptidasen" verhältnismäßig groß, wenn auch geringer als die der Proteinasen ist. Dies gilt jedoch in erster Linie nur für die Amino-polypeptidase, während die Dipeptidase besonders in wäßriger Lösung leicht ihre Aktivität verliert. Zur Festlegung der Stabilitätsgrenzen ist dementsprechend die Dipeptidase besonders häufig untersucht worden; dagegen liegen für die übrigen Enzyme wenig Angaben vor.

Die **Dipeptidase** ist wohl das unbeständigste proteolytische Enzym überhaupt, wovon ja auch bei der präparativen Darstellung (z.B. aus der Hefe, § 498) Gebrauch gemacht wird.

Toluol stabilisirt die Dipeptidase in wäßriger Lösung, und in Glycerollösung ist sie im allgemeinen haltbar. Bei der präparativen Darstellung wird ihr daher stets Glycerol zugesetzt.

Der Zusatz von Glycerol und Ähnlichem stellt nach RONA und MARSSON **201)** keine Beseitigung von Hemmungskörpern, sondern eine wirkliche Stabilisirung des Enzyms dar, da der Zeitpunkt von wesentlicher Bedeutung ist; so zeigte z.B. eine sofort bei der Herstellung mit Glycerol versetzte Lösung nach einem Monat eine doppelt so hohe Aktivität, wie eine kurz vor Ablauf dieser Frist hiermit versetzte Lösung. Neben Glycerol ist nach RONA und MARSSON **201)** auch Glykol geeignet, aber nicht Erythrit.

In Glycerol-extrakten aus Pankreas vom natürlichen ph = 6,0 ist die Dipeptidase nach GRASSMANN (l. c. 180, S. 7) monatelang beständig. Im wäßrigen Extrakt zerfällt dagegen die Dipeptidase des Malzes beim natürlichen ph = 5,9 bei gewöhnlicher Temperatur und auch bei 1° nach LINDERSTRØM-LANG **210)** bereits in 2 Tagen vollkommen; bei ph = 7,2 scheint sie etwas stabiler zu sein und kann nach Zusatz von Toluol auch bei ph = 5,9 und 1° etwa eine Woche lang ihre Aktivität behalten. Den Einfluß der Begleitstoffe auf die Stabilität zeigt der von LINDERSTRØM-LANG und SATO **202)** beobachtete rasche Zerfall der Dipeptidase in der durch Dialyse von einem Teil der Begleitstoffe befreiten Lösung, der sich aber wieder durch Zusatz von Glycerol unterdrücken läßt. Auch in wäßriger neutraler Erepsinlösung zerfällt die Dipeptidase nach ABDERHALDEN **205)** nach drei bis fünf Tagen vollkommen, und in schwach

201) ***P. Rona, Th. Marsson,*** Unters. über Erepsin. Bioch. Zs., **224**, 384 (392) (1930). — 202) ***K. Linderstrøm-Lang, M. Sato,*** On the determ. and sep. of the proteol. enz. in green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **17**, Nr. 17, S. 22 (1929); Mem. Fac. Sci. Taihoku imp. Univ., **9**, Nr. 2 (1934). S.A. — 203) ***M. Sato,*** Stud. of proteol. enz. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **19**, Nr. 2, (1931). S.A. — 204) ***M. Sato,*** On the stab. of dipeptidase in the extract of muscle of snake Natrix annularis (Hallowell). Mem. Fac. Sci. Taihoku Univ., **9**, Nr. 1 (1933). S.A. — 205) ***E. Abderhalden, A. Schmitz,*** Z. Problem d. Aufteilung des Erepsin- u. Trypsin-komplexes etc. Fermentforsch., **11**, 104 (1929). S.A.

alkalischer Lösung (ph = 9) wird sie nach GRASSMANN (l. c. 181) noch rascher zerstört und ebenso nach ABDERHALDEN 206) in schwach saurer Lösung vom ph = 5,4 (ph = 5,0 nach 207)), während sie bei ph = 7,8 noch am stabilsten ist. Bei ph = 3 und ph = 9 nimmt ihre Aktivität nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 208) bereits in 1½ Stunden auf etwa 1/4 bezw. 1/3 ab; ebenso WILLSTÄTTER und GRASSMANN (l. c. 182). Die Dipeptidase der Wirbellosen scheint sogar so unbeständig zu sein, daß sie von MANSOUR-BEK (l. c. 193) aus keinem Adsorbat isolirt werden konnte, wie schnell und schonend auch gearbeitet wurde. Die Gewebs-peptidase der Wirbeltiere ist nach STANDENATH 212) dagegen im natürlichen Extrakt ziemlich beständig, während die Dipeptidase des Serums wieder hinfälliger ist. Die Dipeptidase des Magens wird bei ph = 5,0 auch in Glycerol-lösung nach LINDERSTRØM-LANG und HOLTER 213) rasch zerstört, während sie in neutraler Glycerol-lösung (30 %) recht beständig ist, besonders bei Gegenwart von Phosphat-puffer.

Durch mehrstündiges Schütteln, auch in frischem Glycerol-extrakt, nimmt die Dipeptidase des Erepsins nach ABDERHALDEN (l. c. 279) an Aktivität merklich ab.

Durch die verschiedene Stabilität unterscheiden auch LINDERSTRØM-LANG und SATO 202), (l. c. 234, 235) die beiden von ihnen hypothetisch geforderten Dipeptidasen. Bezeichnen wir mit diesen Autoren mit Dipeptidase I die bevorzugte Wirkung auf Alanyl-glycin und Glycyl-glycin und mit Dipept. II die bevorzugte Wirkung auf Leucyl-glycin, so ergibt sich nach den Untersuchungen von SATO 203) an Extrakten aus frischem und getrocknetem Malz bei ph = 6,0 und — 10° bis + 40° in einer Versuchsdauer bis zu 114 Stunden unabhängig von der Temperatur eine größere Stabilität für Dipeptidase II in wäßriger Lösung bei Abwesenheit von Toluol, während umgekehrt bei Gegenwart von Toluol Dipeptidase I stabiler ist; ebenso LINDERSTRØM-LANG 209). In 44 %igem Glycerol sind beide Enzyme stabil. In 88 %igem Glycerol dagegen fällt die Aktivität von Dipeptidase I rasch ab, während sie für Dipeptidase II konstant bleibt. Nach RONA und MARSSON 201) handelt es sich hierbei jedoch um Zufallsbefunde: eine konstante Abnahme der Aktivität von Dipeptidase I gegenüber der von Dipeptidase II konnte nur bei ungereinigten wäßrigen Fermentlösungen, nicht aber in gereinigten oder in Glycerin-extrakten festgestellt werden. Demgegenüber stellte SATO 204) bei erneuten Untersuchungen an Schlangenmuskeln fest, daß sich die Stabilität der beiden Dipeptidasen bei der Herstellung des Extraktes in Abhängigkeit von den Begleitstoffen und vom ph verschieden ändert, wobei sich Dip. II im Großen und Ganzen als stabiler erwies (213a).

Die **Amino-polypeptidase** ist erheblich stabiler als die Dipeptidase; ihre Stabilität ist dementsprechend weniger untersucht und nicht so genau bestimmt. Nach GRASSMANN (l. c. 181) ist sie in neutraler und schwach alkalischer Lösung ziemlich haltbar, wird aber in stärker alkalischer Lösung leicht inaktiv und ebenso bei der Herstellung von Trockenpräparaten.

Bei ph = 7,0 ist ihre Aktivität in 1½ Stunden nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 208) unverändert geblieben, bei ph = 3,0 hat sie um etwa 1/5, bei ph = 9,0 um etwa 1/3 abgenommen. Durch Acetonfällung nach BALLS und KÖHLER (l. c. 178) hergestellte hochgereinigte Präparate sind weniger stabil, ebenso nimmt die Stabilität bei der Dialyse ab (BALLS und KÖHLER, l. c. 177, 178). ABDERHALDEN 205) konnte 18 Tage hindurch eine gleichbleibende Aktivität gegenüber d,l-Leucyl-glycyl-d,l-leucyl-glycin bei einer wäßrigen Erepsinlösung feststellen. Auch schutzkolloid- und glycerolfreie neutrale Amino-polypeptidase-lösungen sind nach BALLS und KÖHLER (l. c. 177, S. 130) ziemlich haltbar. Die Aktivität der Amino-polypeptidase aus *Murex* bleibt nach MANSOUR-BEK (l. c. 194) im Eisschrank mindestens 24 Stunden unverändert. Aber

206) ***E. Abderhalden c.s.,*** Z. Frage der Identität der Chloracetyl-l-alanin spalt. Komponente etc. Fermentforsch., **13,** 408 (421) (1932). S.A. — 207) ***H. Lüers, L. Malsch,*** Z. K. der proteol. Enz. des Malzes. Ws. für Brauerei, **46,** 265, 275 (1929). — 208) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls, J. Waldschmidt-Graser,*** Über Dipept. u. Polypept. aus Darmschleimhaut. Ber. Chem. Ges., **62,** 956 (1929). — 209) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Ueber die Einheitl. der Darmdipeptidase. Zs. phys. Chem., **188,** 48 (1930). — 210) ***C. K. Mill, K. Linderstrøm-Lang,*** Note on the proteol. enz. in green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **17,** Nr. 10, S. 9 (1929). S.A. — 212) ***F. Standenath,*** Z. K. der Eigenschaften von Gewebe- u. Serum-Proteasen. Fermentforsch., **9,** 18 (27) (1926/28). — 213) ***K. Linderstrøm-Lang, H. Holter,*** Verteil. der Pept. in d. Schleimh. etc. Zs. phys. Chem., **226,** 177, (183) (1934). S.A. — 213a) ***M. Sato, Y. Tsuchiya,*** Dipept. of liver of snake Natrix annularis (Hallowell). Jl. of Soc. trop. Agricult., **5,** Nr. 4, 436 (1933). S.A.

durch mehrstündiges Schütteln verliert die Amino-polypeptidase aus Erepsin auch in frischem Glycerin-extrakt nach ABDERHALDEN (l. c. 279) etwa die Hälfte ihrer Wirksamkeit.

Die **Prolylpeptidase** (Prolinase) von GRASSMANN ist in Glycerol-extrakten aus Darmschleimhaut vom natürlichen ph = 6,0 monatelang beständig (l. c. 180); bei ph = 5 und in Gegenwart von nur 40 % Glycerol erfolgt dagegen schon innerhalb eines Tages deutliche Abnahme der Aktivität und bei ph = 4,0 in der gleichen Zeit völlige Zerstörung. Bei alkalischer Reaktion steht die Prolylpeptidase in ihrer Beständigkeit zwischen der Dipeptidase und der Amino-polypeptidase. Durch mehrstündiges Schütteln des frischen Glycerol-extraktes verliert die Prolylpeptidase nach ABDERHALDEN (l. c. 279) erheblich an Aktivität.

Die kristallisirte **Carboxy-Polypeptidase** von ANSON (l. c. 171) verliert ihre Aktivität erst beim Erhitzen ihrer wäßrigen Lösung bis zur Koagulation des Globulins, und zwar geht die Aktivitäts-verminderung der koagulirten Proteinmenge parallel.

Die katheptische Carboxy-polypeptidase (aus Schweineleber) ist sehr viel weniger beständig als die tryptische, auch unbeständiger als die entsprechende Proteinase; sie verliert nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 148, S. 39) in 15 Stunden bei ph = 10 die Hälfte ihrer Aktivität und wird bei ph = 3,5 in der gleichen Zeit vollkommen unwirksam. Die katheptische Carboxy-polypeptidase der Hefe ist sogar so unbeständig, daß sie bisher überhaupt noch nicht näher untersucht werden konnte, s. hierzu GRASSMANN (l. c. 155, S. 149).

b) Adsorptionsverhalten.

Es ist schwierig, ganz allgemein festzulegen, welches Enzym sich bei einem bestimmten ph an ein bestimmtes Adsorbens bindet, da das Adsorptionsverhalten sehr stark von den Begleitstoffen beeinflußt wird. Hinzu kommt, daß die Adsorptions-versuche meist mit unreinen Enzymlösungen angestellt wurden, da sie ja dem Endzweck der Reinigung und Trennung der einzelnen Ferment-individuen dienen sollten, ganz abgesehen davon, daß, wie bereits betont, noch keineswegs feststeht, ob alle bisher abgetrennten Peptidasen Ferment-individuen und nicht noch Gemische mehrerer verwandter Enzyme darstellen. An sich ist natürlich das Adsorptionsverhalten von der elektrischen Natur des Enzyms abhängig, indem „positive" Enzyme von sauren Adsorbentien aufgenommen werden und umgekehrt. Dafür könnten in erster Linie dieselben Gruppen im System Enzym verantwortlich sein, wie für die katalytische Aktivität selbst, also die „Wirkgruppen". Aber andererseits wird ja auch der „Träger" nicht ohne Einfluß auf die elektrische Natur des Systems sein, und zudem die Aufladung auch wieder stark von den Begleitstoffen abhängen. Diese Einflüsse können sogar bis zu einer Umladung führen.

Bis ins Letzte durchgeführt wird diese Auffassung von FODOR c.s. 214), der nicht nur die Änderung des Adsorptionsverhaltens, sondern fast alle Eigenschaften einschließlich der specifischen Wirkung auf verschiedenartig gebaute Peptide dem Einfluß der Begleitstoffe zuschreibt. Er nimmt an, daß alle diese Eigenschaften vom „Träger" abhängen und bezeichnet als „Träger" in diesem Sinne nicht nur die natürlich mit den Fermenten vorkommenden oder ihnen zugesetzten Proteine, sondern jede das Enzym „tragende" Substanz, wie die verschiedenen Adsorbentien, die verschiedenen Elutionsmittel und sogar auch die Substrate. Die von FODOR c.s. 214) ausgeführten umfangreichen Untersuchungen über die Änderung der enzymatischen Wirkung durch Adsorption und Elution mit verschiedenen Stoffen können demnach hier nicht einzeln aufgeführt werden, da sie von ihm ja nicht bestimmten Enzymtypen zugeschrieben werden und demnach eine ganz anders geartete Besprechung von anderen Gesichtspunkten aus erfordern würden.

Die Begleitstoffe können nun andererseits auch die Oberfläche des Adsorbens verändern und diese hierdurch für das Enzym je nachdem leichter oder schwerer zugänglich machen bezw. das Enzym sogar vollständig aus der Adsorption verdrängen. So sinkt z. B. die an Tonerde

---

214) ***A. Fodor c.s.***, Natur des peptidspaltenden Fermentes. Kolloid-Zs., **37**, 32, 37, 159, 168 (1925), **39**, 56, 240 (1926); Zs. phys. Chem., **160**, 169 (1926), **176**, 17 (1928); Fermentforsch., **10**, 274 (1928/29), **12**, 67 (1930); Bioch. Zs., **229**, 16 (1930), **238**, 283 (1931).

A aus Hefe-autolysaten adsorbirbare Menge Dipeptidase nach „Vorbehandlung" der Tonerde mit Hefe-autolysat unter sonst gleichen Verhältnissen nach GRASSMANN (l. c. 154, S. 61; l. c. 181, S. 820; l. c. 183) von 97 % auf 55 %.

Am wenigsten durch Begleitstoffe entstellt ist nach WALDSCHMIDT-LEITZ und BALLS 215) das Adsorptionsverhalten von Dipeptidase und Amino-polypeptidase der Darmschleimhaut.

Die von WALDSCHMIDT-LEITZ und BALLS 215) angestellten Versuche über die Adsorption dieser Enzyme durch Eisenhydroxyde verschiedener Darstellung bei ph = 4,0 sind auch von allgemeinem, über den Specialfall hinausgehendem Interesse, da sich bei diesen ergab, daß zwar in Übereinstimmung mit der üblichen älteren Ansicht für die „allgemeine Adsorption" die Oberflächen-entwicklung der Adsorbentien von Bedeutung ist, während für die „specifische Adsorption" ebenso bei den Enzymen wie in anorganischen Systemen (Gas-adsorption an Metallen, Mehrstoff-katalyse) chemisch definirte Restvalenzen in den Kristalliten (WALDSCHMIDT-LEITZ; entsprechend den „aktiven Zentren" von TAYLOR, PIETSCH und anderen) entscheidend sind. Die Ergebnisse seien daher kurz angegeben; ++ = starke, + = mäßige, — = keine Adsorption von Am. (= Amino-polypeptidase) bezw. von Dip. (= Dipeptidase):

Adsorbens	Am.	Dip.
Eisenhydroxyd, rot, frisch gefällt	++	++
Gefälltes Eisenhydroxyd, zwei Jahre gealtert	+	++
Gelbes Eisenhydroxyd (Fe_2O_3, H_2O), frisch gefällt ..	—	++
Geglühtes Eisenoxyd, Hämatit (Fe_2O_3)	—	++
Natürlicher Goethit (Fe_2O_3, H_2O)	—	—

Im Folgenden seien die wichtigsten Angaben über die Adsorbirbarkeit der einzelnen Enzyme verschiedener Herkunft an die präparativ wichtigsten und meist benutzten Adsorbentien: Tonerde, Kaolin, Eisenhydroxyd, Kieselgur zusammengestellt; die Untersuchungen sind wohl meist bei Zimmertemperatur ausgeführt, da nähere Angaben fehlen; nur GRASSMANN (l. c. 154) hat die Adsorption der Dipeptidase bei 0° bestimmt. Auf Einzelheiten kann hier natürlich nicht eingegangen werden; diese sind auch meist nur für das betreffende Präparat und nicht für das Enzym schlechthin von Bedeutung.

Adsorption an basische Tonerde.

Enzym	Herkunft	opt. ph	Material, Ausbeute	Literatur
Dipeptidase	Pankreas	4,7	Cγ	WALDSCHMIDT-LEITZ 216)
	Darm	4,0	Cγ	WALDSCHMIDT-LEITZ 215)
	Hefe	4,9	A, bis 65 % *)	GRASSMANN (l. c. 154, 181)
	Milz	4	Cγ, 94 %	WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 190)
	Malz	4,7	Cγ, ∼ 48 %	LINDERSTRØM-LANG u. SATO 217)
	Malz	4,3	A, ∼ 60 %	LÜERS u. MALSCH 207)
	Maja	8	Cγ	MANSOUR-BEK (l. c. 193)
Amino-polypeptidase	Pankreas	4,7	Cγ	WALDSCHMIDT-LEITZ 216)
	Darm	4,0	Cγ	WALDSCHMIDT-LEITZ 215)
	Milz	4,0	Cγ	WALDSCHMIDT-LEITZ 219)
	Maja	4,0	Cγ, ∼ 8 %	MANSOUR-BEK (l. c. 193)
	Murex	8,0	∼ 98 %	MANSOUR-BEK (l. c. 194)

*) Die adsorbirte Menge steigt mit der Tonerde-menge bei A und Cγ sowie mit dem Alter der Enzymlösungen an und erreicht günstigstenfalls 97 %.

215) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls,*** Z. K. der Amino-polypeptidase aus Darmschleimhaut. Ber. Chem. Ges., 63, 1203 (1930). S.A. — 216) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck,*** Trypt. u. erept. Wirk. der Pankreasdrüse. Zs. phys. Chem., 147, 286 (304) (1925). — 217) ***K. Linderstrøm-Lang, M. Sato,*** On the determ. and sep. of the proteol. enz. in green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 17, Nr. 17, S. 24 (1929); Mem. Fac. Sci. Taihoku Imp. Univ., 9, Nr. 2 (1934). S.A. — 219) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, J. J. Bek, E. Blum,*** Das proteol. System. in tier. Organen. Zs. phys. Chem., 188, 17 (39, 41) (1930). S.A.

Enzym	Herkunft	opt. ph	Material, Ausbeute	Literatur
Prolylpeptidase	Darm	5,0	Cγ > Kaolin > B > A	GRASSMAN c.s. (l. c. 180)
Protaminase	Pankreas	7,0	A	WEIL (l. c. 169)
Carboxy-	Pankreas	7,0	A	WEIL (l. c. 169)
polypeptidase	Pankreas	7,0	Cγ	WALDSCHMIDT-LEITZ 221)
	Pankreas	7,0	Al_2O_3-Gel	ABDERHALDEN 222)
	Maja	8,0	Cγ	MANSOUR-BEK (l. c. 193)
	Murex	8,0		MANSOUR-BEK (l. c. 194)

Adsorption an saures Kaolin.

Enzym	Herkunft	opt. ph	Material, Ausbeute	Literatur
Dipeptidase	Darm	4,7	—	WALDSCHMIDT-LEITZ c.s.(l.c.166)
	Milz	4	bis zu 100 %	WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 190)
	Muskel	sauer	gut	STANDENATH 212)
	Muskel	∼ 7	kaum	STANDENATH 212)
	Malz	8,0	87 %	LINDERSTRØM-LANG 217)
	Malz	4,2	∼ 72 %	LÜERS u. MALSCH 207)
	Maja	4,1	gut	MANSOUR-BEK (l. c. 193)
Amino-	Milz	4,0	—	WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 219)
polypeptidase	Maja	4,0	gering, ∼ 25 %	MANSOUR-BEK (l. c. 193)
	Murex	4,0	sehr gering, ∼ 4 %	MANSOUR-BEK (l. c. 194)
Carboxy-	Maja	4,0	—	MANSOUR-BEK (l. c. 193)
polypeptidase	Murex	4,0	∼ 50 %	MANSOUR-BEK (l. c. 194)

Adsorption an Eisenhydroxyd.

Enzym	Herkunft	opt. ph	Material, Ausbeute	Literatur
Dipeptidase	Darm	4,0	s. S. 736	WALDSCHMIDT-LEITZ 215)
	Lunge, Niere, Muskel	∼ 7	gering	STANDENATH 212)
	Malz	8,4	77 %	LINDERSTRØM-LANG 217)
Amino-	Darm	4,0	s. S. 736	WALDSCHMIDT-LEITZ 215)
polypeptidase	Maja	7,0	—	MANSOUR-BEK (l. c. 193)
Carboxy-	Murex	4,0	∼ 20 %	MANSOUR-BEK (l. c. 194)
polypeptidase	Leber	3,8	60 % bis 70 %	WALDSCHMIDT-LEITZ 219)
Acylasen	Pankreas	3,6	versch. Gele	ABDERHALDEN 222)

Adsorption an Kieselgur.

Enzym	Herkunft	opt. ph	Material, Ausbeute	Literatur
Dipeptidase	Milz	7,0	bis zu 45 %	WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 190)
Sulfopeptidase	Niere	3,3—4,1	nahezu quantitativ	S. OTANI (l. c. 192)

221) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr,*** Proteinase u. Carboxy-polypept. aus Pankreas. Ber. Chem. Ges., **62**, 2217 (1929). — 222) ***E. Abderhalden, J. Heumann,*** Adsorpt.-Aff. der im Trypsin-komplex enth. Anteile etc. Fermentforsch., **12**, 572 (1931). S.A.

Abgeschlossen: 29. 7. 36. Ber. Phys. 94, H. 1/2.

Durch **Kohle** wird die Dipeptidase aus Organextrakten nicht, aus Serum sehr gut adsorbirt (STANDENATH, l. c. 212).

Genauer untersucht ist der Einfluß der Menge des Adsorbens, der Enzymkonzentration, der Acidität und von Begleitstoffen: für die Dipeptidase der Hefe von GRASSMANN (l. c. 154), für die Bestandteile des Pankreas-trypsins von ABDERHALDEN 222), für die Dipeptidase aus Malz von LINDERSTRØM-LANG und SATO (l. c. 217)

c) Chemische Natur.

Über die chemische Natur der Peptidasen läßt sich zur Zeit noch recht wenig aussagen. Für die **Dipeptidase** nehmen v. EULER und JOSEPHSON 223), 224) (l. c. 236/7) auf Grund der Hemmung ihrer Wirkung durch Aldehyd-reagentien (s. auch § 500) an, daß das Agon den Charakter eines Aldehyds besitzt. Zu der gleichen Anschauung kommt WALDSCHMIDT-LEITZ 225).

Da die ph-Kurve der Glycyl-glycin-spaltung durch Darm-erepsin mit der der Kondensations-geschwindigkeit von Glycyl-glycin mit Glucose übereinstimmt, nimmt WALDSCHMIDT-LEITZ an, daß die Bindung des Peptids in beiden Fällen an die gleichen Gruppen erfolgt, die Dipeptidase also die Natur einer Aldose hat, zumal auch Kondensations-produkte der Peptide mit Glucose nicht von Erepsin gespalten werden, also eine Konkurrenz der Glucose mit dem zwar stärker affinen, aber in geringerer Konzentration vorhandenen Enzym stattfindet, während Fructose keine Kondensations-produkte mit dem Peptid bildet und auch seine Spaltung nicht hemmt. Nach v. EULER 226) sind diese Versuche nicht beweisend, weil diese ph-Kurve nur für die Kondensations-geschwindigkeit aber nicht für das Gleichgewicht gilt, welches kein ph-Optimum aufweist.

Aus der Änderung der ph-Aktivitäts-kurven bei der Spaltung verschiedener Substrate schließen NORTHROP und SIMMS 227), daß die Dipeptidase ein Ampholyt (schwache Säure oder schwache Base) mit der **Dissoziations-konstante** $K = 10^{-7,6}$ ist, und als Ion mit den Substrat-ionen reagirt. Die ältere, abweichende Deutung (l. c. 309) nahmen LEVENE c.s. 228) zurück und schließen sich, auch gestützt auf neuere eigene Befunde, der Ansicht von NORTHROP im großen und ganzen an.

Bei der Hefe-dipeptidase konnte GRASSMANN 229a) neuerdings durch Adsorption an Tonerde $C\gamma$ eine teilweise Trennung von Agon und Pheron erreichen.

Für die **Amino-polypeptidase** schlossen BALLS und KÖHLER (l. c. 177, 178) auf Grund der Tatsache, daß mit abnehmendem Phosphorgehalt bei der Dialyse auch in gleichem Masse die Aktivität der Polypeptidase abnimmt, daß Phosphor einen wesentlichen Bestandteil des wirksamen Systems der Amino-polypeptidase darstelle.

Da aber hochgereinigte Amino-polypeptidase durch Phosphatase aus Niere nicht angegriffen wird, erscheint eine chemische Bindung des P im Enzym selbst nicht wahrscheinlich, wenn auch der hohe P-Gehalt der aktiven Präparate gegen eine rein adsorptive Verankerung spricht. Sie nehmen daher an, daß der Phosphor in irgendwelcher Form einen integralen Bestandteil eines Aktivator-systems der Amino-polypeptidase darstellt, zumal Amino-polypeptidasepräparate, die ihre Aktivität durch Dialyse verloren hatten, auf Zusatz der eingedampften Dialyseflüssigkeit wieder teilweise reaktivirt werden konnten. Diese Angaben wurden von GRASSMANN c.s. 229) in gewisser Weise bestätigt, indem festgestellt wurde, daß die reinen Präparate einen hohen (2 % bis 4 %) P-Gehalt in Form von Adenylsäure besaßen. Jedoch konnte der größte Teil der

---

223) ***K. Josephson, H. v. Euler,*** Enzymat. Spalt. von Dipeptiden. Zs. phys. Chem., **162**, 85 (1926). — 224) ***H. v. Euler, Z. I. Kertécz,*** Z. K. der Peptidasen. Ber. Chem. Ges., **61**, 1525 (1928). — 225) ***E. Waldschmidt-Leitz, G. Rauchalles,*** Z. Spez. der Peptidasen, II. Ber. Chem. Ges., **61**, 645 (1928). S.A. — 226) ***H. v. Euler, E. Brunius,*** Reakt. zw. Zuckerarten u. Aminosäuren. Ann. Chem. Pharm. (LIEBIG), **467**, 201 (207) (1928). — 227) ***J. H. Northrop, H. S. Simms,*** Effect of ph on erepsin hydrol. Jl. of gen. Phys., **12**, 313 (1928). — 228) ***P. A. Levene, R. E. Steiger, L. W. Bass,*** Rel. of chem. struct. to the rate of hydrol. of pept. V. Jl. of Biol. Chem., **82**, 155 (1929). — 229) ***W. Graßmann, L. Emden, H. Schneller,*** Amino-polypeptidase aus Hefe. Bioch. Zs., **271**, 216 (1934). — 229a) ***W. Graßmann, F. Schneider,*** Proteasen. Erg. Enz.-forsch., **5**, 79 (91) (1936).

Adenylsäure durch Fällung mit Natriumacetat und Ammoniumsulfat (s. auch § 498) abgetrennt werden, ohne daß eine Aktivitäts-verminderung des Enzyms eintrat.

Die **Papain-Polypeptidase** enthält nach BERGMANN und ROSS (l. c. 158) wahrscheinlich eine aldehydische Carbonyl-gruppe, da sie durch Phenylhydrazin gehemmt und leicht oxydirt wird.

Die kristallisirte **Carboxy-Polypeptidase** von ANSON (l. c. 171) stellt ein Globulin dar. Es ist jedoch erstens noch nicht festgestellt, um welches Enzym aus der Gruppe der Carboxy-polypeptidasen es sich hierbei handelt, da bisher nur die Spaltung von Chloracetyl-tyrosin gemessen wurde. Zweitens gilt natürlich für diese „kristallisirte Carboxy-polypeptidase" dieselbe Einschränkung wie für alle bisher kristallisirt dargestellten „Enzyme", nämlich, daß mit der Darstellung enzymatisch wirksamer Kristalle ja noch nichts darüber ausgesagt ist, ob diese Kristalle nun wirklich das Enzym selbst sind, oder es nur enthalten; wir kommen auf diese Frage bei dem „kristallisirten Trypsin" von NORTHROP § 521 und ausführlich beim Pepsin zurück. Auf den Protein-charakter der Carboxy-polypeptidase schließen auch SCHULMAN und RIDEAL **230)** aus der Ausbildung von Oberflächenfilmen auf Pufferlösungen und aus deren Verhalten.

2) Einwirkung äußerer Faktoren.

§ 500. Da die Peptidasen erst in den letzten Jahren rein dargestellt worden sind, ist die Einwirkung äußerer Faktoren noch kaum näher untersucht. Dies gilt insbesondere für die Einwirkung von Temperatur und Strahlung, aber auch der optimale ph ist meist nur für die Spaltung bestimmter Substrate durch mehr oder weniger einheitliche Enzym-gemische festgelegt.

a) Temperatur und Strahlen.

Die **obere Grenze der Hitzebeständigkeit** der Peptidasen ist bisher nur für die Chlor-acetyl-o-nitranilin spaltende Acylase exakt bestimmt worden. Diese ist nach BALLS und KÖHLER **231)** bis 70° gut beständig und wird bei dieser Temperatur in zwei bis drei Minuten vollkommen zerstört. Sie ist nach ABDERHALDEN (l. c. 206) gegen Wärme-inaktivirung beständiger als die Chloracetyl-l-alanin angreifende Acylase. Für die kristallisirte Carboxy-polypeptidase gibt ANSON (l. c. 171) an, daß ihre Lösung beim Erhitzen bis zur Koagulation ihre Aktivität verliert, und zwar geht die Abnahme der Aktivität der Menge koagulirten Proteins parallel.

Beim Erhitzen der Dipeptidase des Malzes auf 40° findet nach HOPKINS **232)** bereits vollständige Zerstörung statt. Andererseits fand STANDENATH (l. c. 212, S. 27) die Dipeptidase von Organpreßsäften (Niere, Lunge, Muskel) in ihrer Wirkung auf Glycyl-tryptophan durch einstündiges Erhitzen auf 56° unverändert, auf 60° um die Hälfte vermindert, während die Dipeptidase des Serums bei gleicher Behandlung völlig zerstört wurde. Auch für die Amino-polypeptidase dürfte die obere Grenze der Hitzebeständigkeit 40° nicht wesentlich überschreiten. Weitere Angaben finden sich bei Stabilität § 499.

Über **optimale Wirkungstemperaturen** der Peptidasen liegen keine einwandfreien Beobachtungen vor; ebensowenig ist die Einwirkung von **Strahlen** auf die Peptidasen bisher untersucht worden.

b) Säuren und Alkalien.

Die Peptidasen sind am beständigsten in neutraler, schwach alkalischer und schwach saurer Lösung. Die Dipeptidase scheint gegen Alkali noch etwas empfindlicher als gegen Säure zu sein; bei ph = 6 ist sie ziemlich beständig (s. § 499), bei ph = 9,0 wird sie nach HOPKINS **232)**, NORTHROP und SIMMS (l. c. 227, S. 323) ziemlich rasch zerstört. Umgekehrt scheinen

230) ***J. H. Schulman, E. K. Rideal,*** Dig. of monolayers of prot. Biochem. Jl., **27**, 1581 (1597) (1933). — 231) ***A. K. Balls, F. Köhler,*** Über eine neue proteol. Wirk. v. Darmschleimhaut-Auszügen. Ber. Chem. Ges., **64**, 383 (1931). — 232) ***R. H. Hopkins, J. A. Burns,*** The proteol. enz. of green malt. Jl. Inst. of Brewing, **36**, 9 (1930).

Amino-polypeptidase und Prolylpeptidase stärker säureempfindlich zu sein, während Amino-polypeptidase z.B. gegen Ammoniak nach GRASSMANN (l. c. 183, S. 201) eine ziemlich hohe Beständigkeit besitzt. Ebenso zersetzt sich die Chloracetyl-o-nitranilin spaltende Acylase aus Erepsin nach ABDERHALDEN (l. c. 206) stärker bei ph = 9, (aber auch besonders bei ph = 5,4) als bei ph = 8,1. Weitere Angaben s. bei Stabilität § 499.

Die **Wirkungs-optima** der Peptidasen liegen bei den normalen Fermenten nicht weit auseinander (zwischen ph = 6,7 und 9,0). Nur die Sonderenzyme besitzen manchmal stärker abweichende Wirkungs-optima und auch bei den katheptischen Enzymen, die noch kaum rein untersucht sind, sollen die Optima nach GRASSMANN (l. c. 149, S. 145) zwischen ph = 4 und 7 liegen.

Da die Optima der einzelnen Enzyme aber noch von ihrer Herkunft (Begleitstoffe) abhängig sind, und außerdem noch vielfach von einem Substrat zum anderen etwas schwanken, ist es schwer, die Wirkungs-optima der einzelnen Enzyme eindeutig festzulegen. Die Substrate sind ja nach NORTHROP und SIMMS (l. c. 227) bei den Peptidasen in ähnlicher Weise wie bei den Proteinasen die wesentlich bestimmenden Faktoren für die Festlegung des optimalen ph. So wird z. B. durch Erepsin (Dipeptidase) die saure Glycyl-asparagin-säure (pKs = 4,45) bei ph = 6,0, das basische Glycyl-alanin (pKs = 8,25) bei ph = 8,0 optimal gespalten. Außerdem kann das ph-Optimum auch durch Neutralsalze oder Schwermetalle verschoben werden (s. u.). Die mit „reinen" Fermentlösungen verschiedener Herkunft an den wichtigsten Substraten festgestellten optimalen ph-Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

ph-Optima der Peptidasen.

Enzym	Herkunft	Substrat	ph	Literatur
Dipeptidase	Pankreas	Leucyl- u. Glycyl-glycin	7,8	WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **233)**
	Pankreas, Darm, Milz	Glycyl-l-tyrosin	7,8	WALDSCHMIDT-LEITZ **238)**
	Darm	Leucyl- u. Glycyl-glycin	7,8	WLADSCHMIDT-LEITZ c.s. **233)**
		verschiedene Dipeptide im Mittel	7,6	NORTHROP und SIMMS **227)**
Dipeptidase I		Alanyl-glycin	7,8	LINDERSTRØM-LANG **235)**
		Alanyl-glycin	7,2 *)	LINDERSTRØM-LANG **239)**
Dipeptidase II		Leucyl-glycin	8,1	LINDERSTRØM-LANG **235), 239)**
Dipeptidase	Schweinedarm	Glycyl-glycin	7,9—8,0	EULER und JOSEPHSON **236), 23**
	Darm, Milz	Leucyl-glycin	8,0	WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **240), 243**
	Hefe	Leucyl-glycin	7,8	WILLSTÄTTER und GRASSMANN **24**
		Alanyl-glycin und Ähnliches	7,8	GRASSMANN **243)**

*) Bestimmung in Phosphatpuffer.

233) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner,*** Z. K. des Darmerepsins. Zs. phys. Chem., **151,** 31 (38) (1926). — 234) ***K. Linderstrøm-Lang, M. Sato,*** Spalt. von Glycyl-glycin etc. Zs. phys. Chem., **184,** 83 (1929). — 235) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Darmerepsin. Zs. phys. Chem., **182,** 15 (1929). — 236) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Enzymat. Spalt. von Dipeptiden. Zs. phys. Chem., **157,** 122 (1926). — 237) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Enzymat. Spalt. von Dipeptiden. Ber. Chem. Ges., **59,** 226 (1926). — 238) ***E. Waldschmidt-Leitz, G. v. Schuckmann,*** Zur Spezif. d. Peptidasen, III. Zs. phys. Chem., **184,** 56 (59, 62) (1929). S.A. — 239) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Einheitl. d. Darmdipept. Zs. phys. Chem., **188,** 48 (65) (1930). — 240) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Deutsch,*** Über die proteol. Enz. d. Milz. Zs. phys. Chem., **167,** 285 (289) (1927). — 242) ***R. Willstätter, W. Graßmann,*** Über die Proteasen der Hefe. Zs. phys. Chem., **153,** 250 (263) (1926). — 243) ***W. Graßmann,*** Über die Dipept. u. Polypept. d. Hefe. Zs. phys. Chem., **167,** 202 (207, 217) (1927). S.A. — 243a) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.,*** Dipept. und Polypept. aus Darmschleimh. Ber. Chem. Ges., **62,** 956 (1929).

ph-Optima der Peptidasen.

Enzym	Herkunft	Substrat	ph	Literatur
	Lunge, Muskel, Niere	Glycyl-tryptophan	7—8,5	STANDENATH (l. c. 212)
	Serum	Glycyl-tryptophan	7,0—8,0	
	Leukocyten	Alanyl-glycin	7,2	HUSFELDT 252)
		Leucyl-glycin	8,1	HUSFELDT 252)
	Harn	d,l-Leucyl-glycin	7,8	BUADZE 244)
eptidase II	Schneckenmuskel	Leucyl-glycin	8,0—8,3****)	SATO (l. c. 204, 213a)
eptidase I		Alanyl-glycin	6,6—8,3****)	SATO (l. c. 213a)
eptidase	Pulmonaten	Alanyl-glycin	7,3	GREATZ 245)
	Helix	l-Leucyl-glycin	7,6	ROSÉN 246)
	Astacus	Leucyl-glycin	7,5—8,1	KRÜGER und GRAETZ 247)
	Maja	Glycyl-glycin	8,4	MANSOUR-BEK (l. c. 193. S. 182)
	Murex	Glycyl-glycin	8,0	MANSOUR-BEK (l. c. 194, S. 358)
	Asp. oryzae	Leucyl-glycin	7,5—7,9	GRASSMANN (l. c. 154, S. 109)
eptidase II	Malz	Leucyl-glycin	8,6	SATO 248), 256a)
eptidase I		Alanyl-glycin	7,8	
eptidase		Leucyl-glycin	7,5 *)	LÜERS und MALSCH (l. c. 207)
eptidase I		Alanyl-glycin	7,8	LINDERSTRØM-LANG und SATO 234)
eptidase II		Leucyl-glycin u. Leucyl-diglycin	8,55	LINDERSTRØM-LANG und SATO 249)
		Leucyl-glycin	7,6 **)	MILL und LINDERSTRØM-LANG 250)
eptidase	Gerstenkeimlinge	Alanyl-glycin	7,6	AMBROS und HARTENECK 251)
ydro-peptidase	Pankreas	Glycyl-dehydro-phenyl-alanin	~ 7,8	BERGMANN und SCHLEICH 253)
ylpeptidase	Darm	Prolyl-glycin	~ 7,6	GRASSMANN c.s. 254), (l. c. 140)
		Prolyl-diglycin	7,3	GRASSMANN c.s. (l. c. 140)
	Hefe	Prolyl-alanin	~ 8	FODOR 256)
no-lypeptidase	Darm	Leucyl-diglycin-ester	8,0***)	WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 174)
		d,l-Leucyl-diglycin	7,0—7,2***)	

*) Bestimmung in Phosphatpuffer.

**) Bestimmung in Gegenwart von Phosphatpuffer, der eine hemmende Wirkung ausübt, bei 40°; nach LINDERSTRØM-LANG und SATO 249) besteht jedoch die Möglichkeit, daß diese große Verschiebung des ph-Optimums nicht nur durch eine Neutralsalz-wirkung des Phosphats zustande kommt, sondern daß bei den Versuchen von MILL und LINDERSTRØM-LANG 250) ein anderes Ferment (Dipeptidase I?) wirksam war.

***) Das Optimum bei ph = 7,0—7,2 ist nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 219) nur durch Begleitstoffe vorgetäuscht und tritt auch bei Amino-polypeptidase aus Milz oder Leber nicht auf, sodaß ph = 8,0 das eigentliche Optimum der Amino-polypeptidase darstellt und nicht, wie WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 241) zuerst annahmen, durch beigemischte Dipeptidase hervorgerufen wurde.

****) Das ph-Maximum ist nach SATO (l. c. 213a) bei Dipeptidase I nicht sehr ausgeprägt, während Dipeptidase II zwischen 8,0 und 8,3 ein ziemlich scharfes Maximum besitzt.

244) ***S. Buadze,*** Quant. Best. d. Peptidasenwirk. im Harn. Fermentforsch., 14, 143 (168) (1934). — 245) ***E. Graetz,*** Einige Verdau.-Ferm. im Kropfsaft einheim. Pulmonaten. Zs. phys. Chem., **180**, 305 (1928). — 246) ***B. Rosén,*** Die Proteinase u. d. Aminopolypept. der Helix pomatia. Zs. vergl. Phys., **21**, 176 (1934). — 247) ***P. Krüger, E. Graetz,*** Eiweißferm. d. Flußkrebses. Zs. phys. Chem., **166**, 128 (1927). — 248) ***M. Sato,*** On the peptidases of green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **19**, Nr. 1, S. 2, 18 (1931). S.A. — 249) ***K. Linderstrøm-Lang, M. Sato,*** On the determ. a. separ. of the proteol. enz. in green malt. ibid. **17**, Nr. 17, S. 38 (1929). S.A. — 250) ***C. K. Mill, K. Linderstrøm-Lang,*** On the proteol. enz. in green malt. ibid. **17**, Nr. 10, S. 13 (1929). S.A. — 251) ***O. Ambros, A. Harteneck,*** Die Proteasen höherer Pflanzen. Zs. phys. Chem., **184**, 93 (1929). — 252) ***E. Husfeldt,*** Proteol. Enz. in d. Leukozyten d. Menschen. Zs. phys. Chem., **194**, 137 (157) (1931); Bibl. Laeg., **125**, 90 (1933); BPh **85**, 636. — 253) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Enzymat. Spalt. dehydr. Peptide. Zs. phys. Chem., **205**, 65 (74) (1932). S.A. — 254) ***W. Graßmann, O. v. Schoenebeck, G. Auerbach,*** Über d. enzymat. Spaltb. d. Prolinpeptide, II. Zs. phys. Chem., **210**, 1 (1932). S.A. — 256) ***A. Fodor, M. Frankel, S. Kuk,*** Spalt. v. Prolin-Polypept. Bioch. Zs., **229**, 28 (1930). — 256a) ***M. Sato,*** Proteol. enz. of green malt. Mem. Fac. Sci. Taihoku Imp. Univ., **9**, Nr. 2, S. 19 (67) (1934). S.A.

ph-Optima der Peptidasen.

Enzym	Herkunft	Substrat	ph	Literatur
	Darm (versch. Tiere)	Pepton	7,7—7,9	RAWITSCH-SCHTSCHERBO **257)**
	Hefe	Leucyl-diglycin und Aehnliche	6,7—7,0	GRASSMANN **248), 258)**
		Pepton, Alanyl- u. Leucyl-diglycin	7,0	GRASSMANN (l. c. 154, S. 35)
	Leber, Milz	d,l-Leucyl-diglycin	8,0	WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 21
	Serum (Mensch, Schwein)	d,l-Leucyl-diglycin	7,4—7,5	GRASSMANN **259)**
	Leukocyten	Alanyl-diglycin	7,3	HUSFELDT **252)**
	Maja	Leucyl-diglycin	8,2	MANSOUR-BEK (l. c. 193, S. 812)
	Murex	Leucyl-diglycin	8,2	MANSOUR-BEK (l. c. 194, S. 358)
	Asp. oryzae	Leucyl-diglycin	∼ 7,2	GRASSMANN (l. c. 154, S. 109)
'arboxy-polypeptidase (tryptische)	Pankreas	Chloracetyl-l-tyrosin	7,4	WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR (l. c. 221)
	Darm	Chloracetyl-l-tyrosin	∼ 8,0	ABDERHALDEN **261)**
	Pankreatin, käufl.	Pyruvoyl-d, l-phenylalanin	7,6	BERGMANN und SCHLEICH **262)**
	Murex	Chloracetyl-l-tyrosin	∼ 7,6	MANSOUR-BEK (l. c. 194)
'arboxy-polypeptidase (katheptische)	Leber, Milz	Benzoyl-diglycin	4,2	WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 21 S. 24).
'rotaminase	Schweinepankreas	Clupein	∼ 8,0	WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. **263)**
.cylasen	Darmerepsin	Chloracetyl-o-nitranilin	∼ 7,0	ABDERHALDEN **261)**
		Chloracetyl-o-nitranilin u. Benzoyl-triglycin	8,0 ****)	BALLS und KÖHLER **231)**
		Chloracetyl-l-alanin	∼ 7,5	ABDERHALDEN **261)**
		Benzoyl-triglycin	∼ 8,0	ABDERHALDEN **261)**
		Chloracetyl-l-tyrosin	8,4	ABDERHALDEN (l. c. 277, S. 37)
		Chloracetyl-d, l-leucin	8,4	ABDERHALDEN (l. c. 277, S. 37)
ulfopeptidase	Niere	β-Naphthalinsulfo-glycyl-glycin	7,6—8,2	S. OTANI **264)**
	Asp. niger	do.	7,1—7,3	H. OTANI **265)**

Weitere Angaben: Erepsin aus Darmschleimhaut ph-Optimum = 7,1—7,8 für Glycyl-d, l- und Glycyl-l-asparagin-säure, ph = 8 für Glycyl-asparagin (NAKASHIMA **266)**). Erepsin und Trypsinkinase aus Darmschleimhaut ph-Optimum = 7,2—8,1 bezw. 7,2—8,4; schwankt nach ABDERHALDEN **267)** je nach dem verwendeten Substrat. Erepsin ph-Optimum zwischen 7,8 und 8,4 für d,l-Leucyl-glycyl-d,l-leucin, d,l-Leucyl-glycyl-l-tyrosin und Dipeptide des Phenyl-alanins; Trypsinkinase ph-Optimum zwischen 7,1 und 9,0 für verschiedene Polypeptide und Polypeptid-derivate

****) Bei dieser Bestimmung ist nach ABDERHALDEN **261)** der Spontanzerfall des Substrats in alkalischer Lösung nicht berücksichtigt.

257) ***M. I. Rawitsch-Schtscherbo,*** Über d. ph-Opt. . . . bei versch. Tieren. Fermentforsch., **12,** 546 (1931). — 258) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff,*** Über d. Wirkungsw. d. Hefepolypept. Zs. phys. Chem., **175,** 18 (27) (1928). S.A., **179,** 41 (56) (1928). — 259) ***W. Graßmann, W. Heyde,*** Z. K. d. Peptidasen d. Blutserums. Zs. phys. Chem., **188,** 69 (1930). S.A. — 261) ***E. Abderhalden c.s.,*** Z. Frage d. Identität der Chloracetyl-l-alanin spalt. Komponente etc. Fermentforsch., **13,** 408 (411, 423) (1932). S.A. — 262) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Weiteres über Dehydro-dipept. Zs. phys. Chem., **207,** 235 (1932). S.A. — 263) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.,*** Über d. Strukt. d. Protamine, I. Zs. phys. Chem., **197,** 219 (231) (1931). S.A. — 264) ***Sh. Otani,*** Über d. Sulfopeptidase. Acta scholae med. Kioto, **17,** 163 (1934); BPh **85,** 165. — 265) ***H. Otani,*** Über d. Sulfopeptidase d. Pilze. ibid., **17,** 243 (1934); BPh **85,** 415. — 266) ***R. Nakashima,*** Strukt. d. Polypept. u. proteol. Ferm. Jl. of Biochem., **7,** 400 (1927). S.A. — 267) ***E. Abderhalden, W. Zeisset,*** Über d. Wesen d. Ferm.-Wirk. etc. Fermentforsch., **11,** 183 (1930). S.A.

ABDERHALDEN c.s. 268), 269). Extrakte aus Geweben (Leber, Niere) ph-Optimum = 7,1 für Polypeptide und 8,4 für deren Derivate ABDERHALDEN 270).

Das Auftreten verschiedener Maxima in der ph-Kurve der Spaltung eines Substrates deutet im Allgemeinen auf die Anwesenheit mehrerer das Substrat spaltender Enzyme im Präparat.

Ein Beispiel hierfür sind die Versuche von ABDERHALDEN 271), bei denen durch frische Erepsinlösung aus Darmschleimhaut (also Dipeptidase + Amino-polypeptidase) verschiedene Tetrapeptide aus Leucin und Glycin bei ph = 9,3, Dipeptide dagegen bei ph = 7,1 gespalten wurden; nachdem aber (durch Zerfall der Dipeptidase nach etwa 5 Tagen) die Wirkung gegen Dipeptide nicht mehr vorhanden war, wurden die Tetrapeptide optimal bei ph = 7,1 gespalten.

Abb. 66. Leucyl-di-glycin-Spaltung und Wasserstoff-Zahl. Einfluß der Substrat-konzentration auf das ph-Opt. nach 272).

Es kann aber auch andere Gründe haben. So deuten WALDSCHMIDT-LEITZ und BALLS 272) das Auftreten zweier Maxima bei ph = 7,2 und 8,0 in der Spaltung von Leucyl-diglycin durch Amino-polypeptidase durch ein verschiedenes Verhältnis der Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung bei wechselndem ph, da die beiden Maxima nur bei kleinen Substrat-konzentrationen beobachtet werden, bei größeren aber, wie Abb. 66 zeigt, kein ausgesprochenes Optimum zwischen ph = 7 und ph = 8 zu erkennen ist. Der optimale ph ist hier also von der Substrat-konzentration abhängig.

c) Einfluß anorganischer Stoffe.

Oxydationsmittel. Jod und Wasserstoffperoxyd vernichten die Wirksamkeit der Papain-polypeptidase nach BERGMANN (l. c. 158) irreversibel, aber auch die Dipeptidase und Amino-polypeptidase werden durch Jod nach GRASSMANN c.s. (l. c. 229) empfindlich geschädigt.

Neutralsalze. Calciumchlorid hemmt die Glycyl-glycin-spaltung durch die Dipeptidase des Darmes; die Hemmung beginnt nach v. EULER und JOSEPHSON 273) bereits bei einer Konzentration von 0,02 bis 0,03 Mol $CaCl_2$/l bei ph = 7,7. Nach NORTHROP und SIMMS (l. c. 227) hemmt $CaCl_2$ in alkalischer Lösung erheblich stärker als in saurer; am geringsten ist die Hemmung bei ph = ca. 7; hier steigt sie für $CaCl_2$ und auch für Natriumchlorid linear mit dem Logarithmus aus der Salzkonzentration (in Mol/l) an. Ebenso hemmt nach OELKERS 274) Magnesiumchlorid von 0,003 Mol an die Spaltung von Alanyl-glycin, die durch m/2 $MgCl_2$ vollständig aufgehoben wird. Natriumfluorid (0,001—0,1 Mol) und Ammoniumrhodanid (0,0008—0,021 Mol) haben bei ph = 7,8 keinen Einfluß (274).

---

268) ***E. Abderhalden, A. Schmitz,*** Vergl. Stud. über d. Abbau von Polypeptiden etc. Fermentforsch., **10,** 591 (1929). S.A. — 269) ***E. Abderhalden, F. Schweitzer,*** Vergl. Stud. an Hand homologer Dipeptide des d,l-Phenylalanins etc. Fermentforsch., **11,** 224 (1930). S.A. — 270) ***E. Abderhalden, O. Herrmann,*** Z. K. der in Organen vorh. . . . Zellferm. Fermentforsch., **11,** 78 (83) (1929). — 271) ***E. Abderhalden, A. Schmitz,*** Z. Problem. d. Aufteilung d. Erepsin- etc.-komplexes etc. Fermentforsch., **11,** 104 (1929). S.A. — 272) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls,*** Z. K. d. Aminopolypeptidase aus Darmschleimhaut. Ber. Chem. Ges., **63,** 1203 (1206) (1930). S.A. — 273) ***H. v. Euler, K. Josephson,*** Enzymat. Spalt. v. Dipeptiden. Zs. phys. Chem., **161,** 270 (1926). — 274) ***H.A. Oelkers,*** Unters. über Erepsin. Bioch. Zs., **226,** 185 (1930).

Sulfit hemmt die Darmdipeptidase nach JOSEPHSON und v. EULER (l. c. 223) sehr erheblich; 0,02n-Na_2SO_3 setzt die Wirkung gegen Glycyl-glycin bereits um etwa 25 % herab und 0,2n-Na_2SO_3 verhindert sie vollkommen.

Phosphat-ionen setzen die Wirkung der Dipeptidase des Malzes (auf Leucyl-glycin) nach MILL und LINDERSTRØM-LANG (l. c. 250, S. 13) erheblich herab, was GRASSMANN c.s. (l. c. 229) bestätigen; gleichzeitig verschieben sie auch den optimalen ph etwas nach der sauren Seite, s. weiter oben in der Tabelle. Bei der Glycyl-glycin-spaltung durch Darmerepsin konnten v. EULER und JOSEPHSON 273) jedoch keinen Einfluß durch Phosphat-ionen feststellen. Die Amino-polypeptidase wird nach BALLS und KÖHLER (l. c. 177) durch Phosphat-ionen stabilisirt (vgl. auch § 499).

Borat hemmt die Dipeptidase außerordentlich stark; bei ph = 8,0 wird die Glycyl-glycin-spaltung nach VON EULER (l. c. 224) durch 0,01n-H_3BO_3 vollständig unterdrückt.

Citrat begünstigt die Pepton-spaltung durch Papain (katheptische Carboxy-polypeptidase oder Papain-polypeptidase?) nach MASCHMANN und HELMER 275) in ähnlicher Weise wie die specifischen Aktivatoren (Thiole); Näheres s. bei Kathepsin.

Wirkung zahlreicher Ionen auf die „Peptidase" FODOR 276).

Schwermetall-ionen beeinflussen die Wirkung der katheptischen Enzyme sehr erheblich. Inwieweit diese Beeinflussung, die wir beim Kathepsin ausführlich besprechen werden, auch für die katheptischen Peptidasen von Bedeutung ist, ist bei unsrer heute noch sehr mangelhaften Kenntnis von den Eigenschaften dieser Enzyme bisher nicht abzusehen.

Die Einwirkung von Schwermetall-ionen ($Ag^{\cdot}$, $Cu^{\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot}$, $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$, $Pb^{\cdot\cdot}$, $Mn^{\cdot\cdot}$, $Zn^{\cdot\cdot}$, $Sn^{\cdot\cdot}$, $Cd^{\cdot\cdot}$, $Co^{\cdot\cdot}$, $Bi^{\cdot\cdot\cdot}$, $Sb^{\cdot\cdot\cdot}$) auf ereptische und tryptische Enzyme (Dipeptidase, Amino-polypeptidase, Carboxy-polypeptidase, Acylase *)) ist besonders von ABDERHALDEN c.s. 277—279) untersucht worden, wobei meist die Acetate der betreffenden Metalle angewandt wurden.

Hierbei ergab sich, besonders für $Ag^{\cdot}$, $Cu^{\cdot\cdot}$, $Pb^{\cdot\cdot}$ und $Fe^{\cdot\cdot}$, beim optimalen ph des Enzyms meist eine Verzögerung der Spaltungs-geschwindigkeit, die mit der Metall-konzentration zunahm und vielfach zu einer erheblichen Hemmung des Enzyms führte; durch $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ und auch durch $Pb^{\cdot\cdot}$ und $Cu^{\cdot\cdot}$ wurde in einigen Fällen eine Förderung der Spaltung beobachtet. Durch eine Veränderung des ph ließ sich die hemmende Wirkung z.B. der Ag-Ionen teilweise aufheben, und es wurde sogar eine ziemlich erhebliche Verschiebung des optimalen ph des Enzyms durch 10^{-4} Mol $Ag^{\cdot}$/l beobachtet. Die hemmende Wirkung des Ag nimmt mit steigender Substrat-konzentration ab und ebenso (in manchen Fällen) durch Zusatz an sich gleichfalls (aber gering) hemmender unspaltbarer Peptide oder Aminosäuren, während in anderen Fällen (Zusatz stärker hemmender, unspaltbarer Peptide oder Aminosäuren) sich die hemmende Wirkung der beiden Zusätze verstärkte. Durch HCN kann die Silberhemmung jedoch vollkommen aufgehoben werden; ebenso tritt bei Anwendung des Komplexes $K(AgCN)NO_3$ erst bei sehr viel höheren Ag-Konzentrationen eine geringfügige Hemmung ein.

Für verschiedene Substrate ist die Art und vor allem der Grad der Hemmung verschieden. So nimmt insbesondere mit der Kettenlänge der Leucyl-glycin-peptide die Ag-Konzentration zu, die zur Erzielung der gleichen Hemmung erforderlich ist. Auch für die einzelnen untersuchten Enzyme ist Art und Grad der Hemmung verschieden. Doch sind diese Unterschiede nicht so weitgehend, daß in irgend einem Fall ein Enzym erheblich inaktivirt würde,

---

*) ABDERHALDEN 277), 278) untersuchte hier und an anderen Stellen unter anderem die Spaltung von Chloracetyl-l-alanin durch Erepsin-lösungen. Auf die Frage, ob es sich hierbei um dieselbe Carboxy-polypeptidase wie im „Trypsin" oder eine andere Acylase handelt, kommen wir weiter unten noch zurück. ABDERHALDEN's eigene Stellungnahme ist nicht einheitlich. Im Allgemeinen vermeidet er es, von einem bestimmten Enzym zu sprechen.

275) ***E. Maschmann, E. Helmert***, Einfl. d. Salze versch. Puffermisch. auf proteol. u. peptol. Vorgänge. Bioch. Zs., **277**, 97 (1935). S.A. — 276) ***A. Fodor c.s.***, Die Wirkungsw. der Ferm. Fermentforsch., **10**, 274 (288) (1928/29). — 277) ***E. Abderhalden, G. Effkemann***, Einfl. von Schwermetallsalzen auf die Hydrol. von Polypept. etc. Fermentforsch., **14**, 27 (1933). S.A. — 278) ***E. Abderhalden, W. Zeisset***, Z. K. d. im Erepsin- u. Trypsin-komplex enthaltenen Ferm.-system. Fermentforsch., **13**, 330 (1932). S.A. — 279) ***E. Abderhalden, R. Merkel***, Über das Vorhandensein einer Prolinase. Fermentforsch., **15**, 1 (1936). S.A.

ohne daß gleichzeitig die anderen durch dasselbe Schwermetall in etwa dem gleichen Maße geschädigt würden. Es liegt also wohl keine specifische Aktivirung oder Hemmung durch Schwermetalle bei dieser Proteasengruppe vor, wie bei den katheptischen Enzymen. Es scheint sich hier eher um eine Beeinflussung der Substrate, vielleicht durch Bildung von Komplexsalzen zu handeln. Nur die Dipeptidase in ihrem Verhalten zu Zink macht hierbei eine Ausnahme, worauf wir dementsprechend weiter unten bei der specifischen Aktivirung und Hemmung zurückkommen.

Die **Dipeptidase** zeigt bei der Spaltung von d,l-Leucyl-glycin beim optimalen ph = 7,8 bei Gegenwart von 10^{-3} m-Blei- oder Kupfer-acetatlösungen zunächst eine größere Spaltungsgeschwindigkeit als ohne Metall-zusatz, die aber im Laufe des Versuchs unter die normale herabsinkt. Umgekehrt hemmt 10^{-4} m-Silber-acetatlösung die Spaltung in den ersten beiden Stunden vollkommen (277), auch bei der Dipeptidase aus Hefe und Niere fanden GRASSMANN c.s. (l. c. 180, S. 3, Anm. 1) bei 10^{-4} Mol $Ag^{\cdot}$/l vollkommene Hemmung. Im weiteren Verlauf des Versuches tritt zwar Hydrolyse ein, die Spaltungs-geschwindigkeit ist aber geringer als normal (277), 279).

Wird jedoch die Substrat-konzentration erhöht, so nimmt die hemmende Wirkung der Ag-ionen mit steigender Substrat-konzentration ab und in 0,3 m-Substrat-lösung wird mit und ohne 10^{-4} Mol $Ag^{\cdot}$/l der gleiche Endwert der Hydrolyse erreicht. Das ph-Optimum wird nach der alkalischen Seite verschoben; in 10^{-4} m-$Ag^{\cdot}$-lösung ist die Spaltung bei ph = 8,6 ebenso stark wie in $Ag^{\cdot}$-freier Lösung bei ph = 7,8. Das an sich kaum hemmende Glycin, sowie Sarcosyl-l-tyrosin vermindern die $Ag^{\cdot}$-hemmung in geringem Ausmaß, während das an sich stärker hemmende Alanin und ebenso Chloracetyl-d, l-leucin die $Ag^{\cdot}$-Hemmung erheblich verstärken.

In 10^{-3} m-$FeCl_3$-Lösung liegt die Kurve dicht unter der normalen und die Hydrolyse führt auch bei Gegenwart von Eisen-ionen im Gegensatz zu der bei Gegenwart von $Pb^{\cdot\cdot}$, $Cu^{\cdot\cdot}$ und $Ag^{\cdot}$ erfolgten zu dem normalen Endwert (277). Quecksilber-salze inaktiviren die Dipeptidase aus Darmschleimhaut nach WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 166) und GRASSMANN (l. c. 229) vollkommen. Auch gegen Nickel-ionen ist sie sehr empfindlich (l. c. 229).

Die **Prolylpeptidase** wird nach ABDERHALDEN c.s. 277), 280), GRASSMANN (l. c. 180, S. 3, Anm. 1) durch Silbersalze schon in einer Konzentration von 10^{-6} bis 10^{-4} Mol/l sehr erheblich gehemmt. So sinkt die Spaltung von m/20 l-Prolyl-l-tyrosin und Prolyl-alanin durch Zusatz von 10^{-4} m-$AgNO_3$ auf etwa die Hälfte, die von Prolyl-leucyl-glycin auf etwa $^1/_4$ und die von l-Prolyl-glycin nach Zusatz von 10^{-3} Mol $Ag^{\cdot}$/l auf $^1/_{10}$ herab (279).

Die Spaltung von Leucyl-diglycin durch **Amino-polypeptidase** wird beim optimalen ph = 7,8 nach ABDERHALDEN 277) durch Silber-ionen in einer Konzentration von 10^{-6} bis 10^{-4} Mol $Ag^{\cdot}$/l erheblich verzögert, durch 5.10^{-4} Mol $Ag^{\cdot}$/l und mehr gehemmt. Durch 10^{-4} Mol $Ag^{\cdot}$/l wird der optimale ph nach 8,5 verschoben, jedoch ist hier die Spaltung nicht so groß wie bei ph = 7,8 ohne $Ag^{\cdot}$, anders als bei der Dipeptidase. Bei Gegenwart von 10^{-3} Mol $Ag^{\cdot}$/l wird die Spaltung auf etwa $^1/_3$ herabgesetzt (279). Kupfer-salze beschleunigen in kleinen Konzentrationen (bis 10^{-4} Mol $Cu^{\cdot\cdot}$/l), in größeren verzögern sie die Spaltung. Ähnlich wirken Blei-salze, während Salze von Zink, Mangan, Zinn, Cadmium und Kobalt bis zu einer Konzentration von 10^{-2} Mol/l keinen Einfluß haben; bei höheren Konzentrationen dieser Salze tritt möglicherweise eine ph-Verschiebung ein. Durch Wismut findet in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l geringe Hemmung, durch Antimon geringe Förderung statt (277). Auch gegen Quecksilber- und Nickel-Salze ist Amino-polypeptidase nach GRASSMANN (l. c. 229) sehr empfindlich. Abweichend verhält sich Eisen, und zwar besonders als $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$. Während bei Zusatz von 10^{-3} Mol $FeCl_3$/l kein Einfluß festzustellen ist, wird die Spaltung durch 2.10^{-4} Mol $FeCl_3$/l nicht nur beschleunigt, sondern erreicht auch einen etwas höheren Endwert, als ohne Zusatz; $FeSO_4$ (2.10^{-4} und 10^{-3} Mol/l) verzögert dagegen. Bei der Spaltung von d, l-Leucyl-glycyl-d,l-leucin finden sich ähnliche Wirkungen: 10^{-4}m-$Ag^{\cdot}$ hemmt, 10^{-3}m-$Fe^{\cdot\cdot\cdot}$, $Pb^{\cdot\cdot}$ und $Cu^{\cdot\cdot}$ haben keinen Einfluß.

---

280) ***E. Abderhalden, H. Nienburg,*** Verh. von Prolylpolypeptiden etc. Fermentforsch., **13**, 573 (1933). S.A.

Die Spaltung von Chloracetyl-l-alanin durch Erepsin (**ereptische Acylase?**) wird durch die Schwermetall-ionen nach ABDERHALDEN 277) im Allgemeinen in gleicher Weise beeinflußt; nur ist die Hemmung meist stärker als bei der Amino-polypeptidase; eine Förderung wurde in keinem Fall beobachtet: auch $FeCl_3$ hemmt.

Ganz anders verhält sich nach ABDERHALDEN 277) die **tryptische Carboxy-polypeptidase**, bei der auch Art und Größe der Metallwirkung wesentlich vom Substrat abhängig ist, wie folgende Tabelle zeigt; — bedeutet Hemmung, — — starke Hemmung, + Förderung, 0 keinen Einfluß, n. nicht untersucht und E den Essigsäure-rest $—OOCCH_3$:

Substrat	10^{-4}m-$AgNO_3$	10^{-4}m-AgE	10^{-3}m-PbE_2	10^{-3}m-$FeCl_3$	10^{-3}m-CuE_2
d,l-Leucyl-glycyl-d,l-leucin .	n.	—	0	+	0
Chloracetyl-l-tyrosin	— —	n.	—	—	— 0
Chloracetyl-d,l-leucin	0	n.	—	—	—
Phthalyl-glycyl-glycin	—	n.	n.	n.	+ 0

Außerdem findet durch 10^{-4}m-$AgNO_3$-Lösung bei den beiden Chloracetyl-derivaten eine Verschiebung des optimalen ph statt und zwar nach der sauren Seite, von ph = 8,4 ohne Ag·-Zusatz auf ph = 7,8 für Chloracetyl-l-tyrosin und ph = 7,2 für Chloracetyl-d,l-leucin. Bei dem Letzteren ist die Spaltung bei ph = 7,2 in 10^{-4}m-Ag-Lösung ebenso stark wie bei ph = 8,4 ohne Ag·-Zusatz, während bei Chloracetyl-l-tyrosin die Hemmung durch die Änderung des ph nicht aufgehoben wird; sie ist jedoch hier bei ph = 7,8 und auch sogar noch bei ph = 9,8 erheblich geringer als bei dem optimalen ph = 8,4. Bei Zusatz des die Spaltung von Chloracetyl-l-tyrosin geringer als Ag· hemmenden d,l-Leucyl-glycins ist die Spaltung bei Gegenwart und Abwesenheit von 10^{-4} Mol Ag·/l annähernd gleich stark.

d) Einfluß organischer Stoffe.

Formaldehyd verhindert die Wirkung von Dipeptidase und Amino-polypeptidase durch Reaktion mit der Amino-gruppe des Substrats vollständig, während die Carboxy-polypeptidase in ihrer Wirkung durch Formaldehyd nicht beeinflußt wird (ANSON, l. c. 171, NORTHROP 281)), ebensowenig die Chloracetyl-o-nitranilin spaltende Acylase (BALLS und KÖHLER, l. c. 173).

Zucker: Aldosen (Glucose) hemmen die Wirkung der Dipeptidase nach WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 225), während Fructose keinen Einfluß hat. Hemmung durch Kohlehydrate auch BLAGOWESTSCHENSKI 282).

Alkohole: Dipeptidase (283) wird in ihrer Wirkung auf d,l-Leucyl-glycin beim optimalen ph = 7,8 gering gefördert durch: Methanol bis zu einer Konzentration von ~ 0,6 %, Äthylalkohol bis zu ~ 0,6 %, n-Butylalkohol bis zu ~ 0,4 %, tertiären Butylalkohol (Trimethylcarbinol) bis zu ~ 6 %, Isoamylalkohol bis zu ~ 0,4 %; hemmend wirkten CH_3OH > 0,6 %, C_2H_5OH > ~ 0,6 %, C_3H_7OH > ~ 0,1 %, C_4H_9OH > ~ 0,4 %, $C_6H_{11}OH$ > ~ 0,1 %, Isopropyl-> ~ 0,1 %, Isobutyl-> ~ 0,1 %, Isoamyl-> ~ 0,4 %, Benzyl-alkohol > ~ 0,4 %; keine Einwirkung war festzustellen bei n-Amyl-, Heptyl- und Octylalkohol.

Carboxy-polypeptidase wird in ihrer Wirkung auf d,l-Leucyl-glycyl-d,l-leucin beim optimalen ph = 8,4 in ihrer Wirkung gefördert durch CH_3OH bis zu ~ 11 %, C_2H_5OH bis zu ~ 11 %, C_3H_7OH bis zu ~ 10 %, $C_6H_{11}OH$ bis zu ~ 4 %, Isopropyl-alkohol ~ 0,4 %, Isobutyl-alkohol bis zu ~ 1 %; hemmend wirkten CH_3OH und C_2H_5OH bei ~ 25 %, C_3H_7OH > ~ 10 %, C_4H_9OH > ~ 0,1 %, $C_5H_{11}OH$ > ~ 0,2 %, Isopropyl-> ~ 0,4 %, Isobutyl-> ~ 1 %, tertiärer Butyl-, Isoamyl- und Benzyl-alkohol > ~ 0,1 %.

---

281) ***J. H. Northrop,*** Isol. and prop. of pepsin and trypsin. The Harvey Lect. **1934/35,** 229 (240). S.A. — 282) ***A. Blagowestschenski,*** Einfl. hoher Konz. neutraler Stoffe etc. (Peptidasen). Bioch. Zs., **168,** 6 (1926). — 283) ***E. Abderhalden, F. Reich,*** Einfl. versch. Alkohole etc. (Peptidasen). Fermentforsch., **11,** 64 (1929). S.A.

Chloroform schädigt nach GRASSMANN (l. c. 181, 186) die Dipeptidase sehr erheblich, während Amino-polypeptidase unempfindlich gegen $CHCl_3$ ist, wovon auch bei der präparativen Trennung Gebrauch gemacht wird (s. § 498).

Phenylhydrazin hemmt die Papain-polypeptidase, die Hemmung kann aber nach BERGMANN (l. c. 158) durch Aktivatoren (HCN etc.) aufgehoben werden. Auch die Dipeptidase des Darmes wird nach JOSEPHSON und v. EULER (l. c. 223) durch Phenylhydrazin gehemmt, und zwar zunehmend im Verlaufe des Fortschritts der Reaktion. **p-Toluidin** hat dagegen keinen Einfluß, während **Anilin** wieder stark hemmt (l. c. 224).

Von den einfachen **Fettsäuren** üben nach BUDDE **284)** Essigsäure, Buttersäure, Capronsäure und Milchsäure (Gegensatz zu TAMURA **285)**) eine hemmende Wirkung auf Dipeptidase (Pankreas) aus, während Ameisensäure und Bernsteinsäure bei dem gleichen ph wirkungslos sind.

Durch die **Phosphatide** Lecithin und Kephalin wird Dipeptidase nach RONDONI **286)**, **287)** zu 37 % bezw. 30 % gehemmt, Amino-polypeptidase nicht beeinflußt. Auch auf die tryptische Carboxy-polypeptidase hat Kephalin keinen Einfluß, während Lecithin um 18 % hemmt; (wie beim Trypsin (s. § 529) Hemmung der Enterokinase).

Coffein fördert in einer Konz. von 25 bis 250 mg pro 100 cm³ Dipeptidase (d,l-Leucyl-glycin) **(283)**; **Nicotin** ohne Einfluß. Mit **Chinin** und **Chinidin** kamen v. EULER und KERTÉCZ (l. c. 224) zu keinen eindeutigen Ergebnissen.

Eiweiß-abbauprodukte: Proteine hemmen nach dem vorliegenden Material nicht, s. z.B. für Ovalbumin l. c. 161. Über den Einfluß von Aminosäuren und Peptiden s. auch unten bei der specifischen Hemmung und Aktivirung durch Spaltprodukte. — Wie bereits im H.W. S. 868 betont wurde, wird die Peptidspaltung stets durch alle in der Natur vorkommenden Aminosäuren gehemmt, nur Glycin, das kein asymmetrisches C-Atom besitzt, macht nach ABDERHALDEN (l. c. 277) bisweilen eine Ausnahme. Weitere Untersuchungen von ABDERHALDEN c.s. **288)**, **289)** (l. c. 277), auch mit β-Aminosäuren und Aminen, lassen keinen deutlichen Zusammenhang zwischen Hemmung und Affinität zu bestimmten Gruppen erkennen, die Hemmung wechselt stark nach der Art des Substrates.

Nach GRASSMANN und KLENK (l. c. 188) scheint überhaupt die Zusammensetzung des Substrates für die Hemmbarkeit durch eine (auch nicht im Substratpeptid enthaltene) Aminosäure maßgebend zu sein. So wird die Spaltung von Glycyl-glycin durch Dipeptidase aus Niere durch Alanin auf ~ 1/5 ihres Wertes herabgesetzt, während bei Leucyl-glycin keine Hemmung eintritt, und ebenso verhalten sich Diglycyl-glycin bezw. Leucyl-diglycin bei der Spaltung durch die Amino-polypeptidase der Hefe.

Die Spaltung von d,l-Leucyl-glycin durch Dipeptidase (aus Darm-erepsin) wird gehemmt durch l-Leucin < l-Valin < Glycin < l-Alanin < β-Alanin < d-Alanin < Sarkosin < l-Phenyl-alanin < Hippursäure; nur β-Aminobuttersäure zeigte eine geringfügige Beschleunigung **(288)**. Später (l. c. 277) fand ABDERHALDEN auch bei Glycin keine Beeinflussung. — Bei Spaltung von Glycyl-d,l-leucin hemmte Glycin < l-Leucin < β-Aminobuttersäure < d-Valin < l-Valin < Benzoyl-d,l-alanin < Sarkosin < d-Alanin < l-Alanin < β-Alanin < Hippursäure < l-Phenylalanin. Bei d-Valyl-glycin, d,l-Aminobutyryl-glycin ähnliche Reihenfolgen der hemmenden Wirkung **(288, 289)**. Bei wechselndem ph ist die hemmende Wirkung verschieden groß; die größte Hemmung beim optimalen ph zeigte jedoch nur Hippursäure, während v. EULER und JOSEPHSON (l. c. 236

---

284) ***O. Budde***, Beeinfl. von Erepsin und Trypsin durch Coligär. Zs. Kindhlk., **46**, 195 (1928). S.A. — 285) ***Sh. Tamura***, Z. K. des Verlaufs der ferm. Polypeptidspalt. Acta scholae med. Kioto, **6**, 441 (1924); BPh **32**, 640. — 286) ***P. Rondoni***, Einfl. der Phosphatide auf proteol. Ferm. Zs. phys. Chem., **207**, 103 (1932). — 287) ***P. Rondoni***, L'influenza dei fosfatidi sugli enzimi proteol. Boll. Soc. Ital. Biol. sper., **7**, 339 (1932). — 288) ***E. Abderhalden c.s.***, Prüfung des Problems über spez. Wirk. von Erepsin etc. Fermentforsch., **10**, 233 (1928). S.A. — 289) ***E. Abderhalden, O. Herrmann***, Über den Einfl. verschied. Zusätze etc. Fermentforsch., **10**, 610 (1928). S.A.

S. 127) bei der Spaltung von Glycyl-glycin auch durch Glycin und Alanin die stärkste Beeinflussung beim optimalen ph fanden; auch Glycin-anhydrid hemmt. Bei der Spaltung von Alanyl-glycin hemmen nach Oelkers (l. c. 274) Glycin und alle Formen des Alanins. Die Spaltung von Glycyl-tyrosin durch Erepsin und Hefepeptidase wird dagegen wieder nach Tamura **285)** durch Glycin kaum, mehr durch Glutaminsäure und d-Alanin vermindert.

α-Naphthylamin begünstigt die Spaltung von d,l-Leucyl-glycin, β-Naphthylamin < p-Toluidin < Colamin hemmen; bei Spaltung von Glycyl-d,l-leucin haben Colamin und β-Naphthylamin keinen Einfluß, Harnstoff < p-Toluidin < α-Naphthylamin hemmen **(288)**. Die aus Pepton durch Colibakterien gebildeten Amine zeigen nach Budde **284)** keine Wirkung, während die Peptone selbst hemmen. Von Peptiden hemmt nach Abderhalden (l. c. 277) Sarcosyl-l-tyrosin die d,l-Leucyl-glycin-spaltung gering, erheblich stärker Chloracetyl-d,l-leucin. Auch Chloracetyl-tyrosin und Acetursäure hemmen nach Balls und Köhler (l. c. 176), während v. Euler und Josephson (l. c. 236) bei kleinen Acetursäure-konzentrationen keine Hemmung beobachteten und ebensowenig durch Benzoyl-diglycin. Die Spaltung der Glycyl-m- und p-aminobenzoesäuren wird durch die o-Verbindung nach Balls und Köhler (l. c. 176) gleichfalls gehemmt. Sie sehen hierin einen Beweis dafür, daß nicht die sterische Konfiguration der o-Verbindung ihre Spaltbarkeit verhindert, sondern die durch die o-Konfiguration hervorgerufene große Nähe der sauren Gruppe zur Peptidbindung (s. auch §§ 480, 502).

Amino-polypeptidase wird in ihrer Wirkung auf d,l-Leucyl-glycyl-d,l-leucin nach Abderhalden **289)** durch Glycin und sehr erheblich durch Hippursäure gehemmt. Die Leucyl-diglycin-spaltung wird dagegen nach Balls und Köhler (l. c. 176, S. 300) durch Glycin, α-Alanin, Leucin und Glutaminsäure nicht beeinflußt, jedoch durch alle Substanzen gehemmt, die eine an eine saure Gruppe gebundene Iminogruppe besitzen, wie Benzoyl-, [Brom-isocapronyl]-, [p-Nitro-benzoyl]-glycin, Acetursäure, Phthalimid, Sarcosin, aber nicht Allantoin, Kreatin oder Glycin-anhydrid.

Die Spaltung von Benzoyl-d,l-leucyl-glycin durch Carboxy-polypeptidase wird nach Abderhalden **288)** durch d-Alanin nicht beeinflußt, gehemmt durch die Säuren: Hippursäure < Sarcosin < l-Phenylalanin = l-Leucin < Glykokoll < l-Alanin = β-Aminobuttersäure und durch die Amine Colamin < α- und β-Naphthylamin = p-Toluidin. Die Spaltung von Phenyl-isocyanat-glycyl-d,l-leucin beeinflussen Sarcosin, l-Valin, Colamin und p-Toluidin nicht, α- und β-Naphthylamin hemmen etwas und stärker die Säuren l-Leucin = β-Aminobuttersäure = β-Alanin = l-Alanin < d-Alanin < Benzoyl-d-alanin = Phenylalanin = Glycin < Hippursäure. Die Spaltung von d,l-Leucyl-glycyl-d,l-leucin wird nicht beeinflußt durch Hippursäure, d,l-Valin und etwas gehemmt durch d-Alanin, d-Leucin < d-Phenylalanin < Glykokoll = Alanin < d-Glutaminsäure. Von den untersuchten Dipeptiden haben Glycyl-d,l-leucin, Glycyl-d,l-valin, d,l-α-Aminobutyryl-glycin, d,l-Alanyl-d,l-valin, Glycyl-glycin eher einen fördernden Einfluß, d,l-Leucyl-glycin hemmt etwas, Glycyl-d,l-norvalin stark **(289)**. Die Spaltung von Chloracetyl-l-tyrosin wird durch d,l-Leucyl-glycin gleichfalls etwas gehemmt (l. c. 277). Hemmung des „Trypsins" (also Carboxy-polypeptidase) durch Aminosäuren s. auch Schäffer **290)**.

Aktivirung der „Peptidase" durch Aminosäuren und Hemmung durch Glycin Fodor **291), 292)** (l. c. 276, S. 282).

Blutserum hemmt die Dipeptidase-wirkung gegen Leucyl-glycin (Waldschmidt-Leitz, l. c. 161); Hemmung durch Blutserum auch Standenath **293)**.

Den Einfluß von **Bakterien** prüfte Budde **284)** an der Glycyl-glycin-spaltung durch Dipeptidase des Pankreas unter Zusatz von lebenden und abgetöteten Coli-kulturen; meist Hemmung vermutlich durch Adsorption des Enzyms an die Bakterien-leiber.

e) Specifische Aktivirung und Hemmung.

§ 500a. Von den eigentlichen Aktivatoren und Hemmungskörpern sind die wichtigsten die **Thiole** und HCN. Deren Wirkung auf die Peptidasen ist zumeist gleichzeitig mit ihrer Wirkung auf die Proteinasen untersucht worden. Sie wird daher im Zusammenhang bei den Kathepsinen behandelt, wo auch die Einzelliteratur angegeben wird. Hier sollen nur die vereinzelten Beobachtungen über die Beeinflussung der ereptischen Enzyme, die im Allgemeinen unspecifisch ist, kurz mitgeteilt werden. Diese werden im Gegensatz zu den katheptischen durch H_2S und HCN nicht aktivirt Waldschmidt-Leitz c.s. (l. c. 219, S. 21, 37), wobei noch betont sei, daß auch die pflanzliche Dipeptidase nicht zu den katheptischen Enzymen gehört, also auch durch HCN gehemmt

290) ***Y. Schäffer,*** Act. de la trypsine. Soc. Biol., **99**, 669 (1928). — 291) ***A. Fodor, R. Cohn,*** Wirkg. versch. Aminosäuren auf Hefepept. Zs. phys. Chem., **176**, 17 (1928). — 292) ***A. Fodor, R. Schoenfeld,*** Vergl. Vers. über die Spalt. etc. Zs. phys. Chem., **170**, 231 (1927). — 293) ***F. Standenath,*** Z. K. der Antifermente. Fermentforsch., **9**, 9 (1926).

wird (AMBROS und HARTENECK, l. c. 251). Geschädigt werden die ereptischen Enzyme incl. der Prolylpeptidase, nicht beeinflußt die tryptische Acylase und die Prolinpeptidase.

H_2S schädigt Erepsin erheblich: die Aktivität der Dipeptidase gegen d,l-Leucyl-glycin und ebenso der ereptischen Acylase gegen Chloracetyl-d,l-leucin und -l-Alanin nimmt nach ABDERHALDEN (l. c. 280, S. 583) nach 14stündiger Behandlung mit H_2S auf etwa $^1/_8$ ab. Auch die Prolylpeptidase wird durch H_2S erheblich gehemmt (l. c. 254, S. 11). Nach GRASSMANN **294)** (l. c. 258) wird auch Amino-polypeptidase durch H_2S stark geschädigt; ebenso nach ROSÉN (l. c. 246) (*Helix*). ABDERHALDEN (l. c. 279) fand dagegen nur geringe Hemmung. — Die tryptischen Acylasen werden nach ABDERHALDEN (l. c. 261) kaum, nach BALLS und KÖHLER (l. c. 173) garnicht geschädigt (Unterschied der tryptischen und ereptischen Acylasen).

HCN in einer Konzentration von 0,02 Mol/l setzt die Aktivität der Dipeptidase nach GRASSMANN c.s. (l. c. 254, S. 11) auf 0 bis $\sim$ $^1/_4$, die der Amino-polypeptidase auf etwa die Hälfte und die der Prolylpeptidase auf $^1/_3$ bis $^3/_4$ herab; der Grad der Schädigung hängt von der Herkunft des Ferments und vom Alter der Enzymlösung ab. ABDERHALDEN (l. c. 279) fand in 0,04 %iger HCN-Lösung eine noch stärkere Schädigung der Dipeptidase und der Prolylpeptidase, während die Wirkung der Amino-polypeptidase nur um etwa 10 % abnahm, wenn auch die Spaltung sehr viel langsamer verlief. Auch ROSÉN (l. c. 246) fand empfindliche Hemmung der Amino-polypeptidase durch HCN. 0,002n-KCN schädigen die Dipeptidase nach JOSEPHSON und v. EULER (l. c. 223) bereits um etwa 50 %, während die Chloracetyl-o-nitranilin spaltende Acylase (l. c. 173) durch HCN nicht angegriffen oder geschädigt wird. Die Prolinpeptidase ist nach BERGMANN **296a)** dadurch zu charakterisiren, daß sie im Gegensatz zur Amino-polypeptidase durch Cyanid kaum gehemmt wird.

Nach LINDERSTRØM-LANG **295)** kann das Cyanid-ion auch für die ereptische Dipeptidase als Aktivator fungiren und zwar in Gegenwart von Zink.

HCN an sich hemmt, wie eben beschrieben, die Wirkung der Dipeptidase auf Alanylglycin bei ph = 8 und ebenso Zn für sich allein bei höheren Konzentrationen in steigendem Maße mit zunehmendem Gehalt der Lösung an $Zn^{\cdot\cdot}$. Bei sehr kleinen Konz. dagegen (unterhalb etwa 3.10^{-3}n) wirkt $Zn^{\cdot\cdot}$ aktivirend, maximal in 0,8 bis 4.10^{-4}n-Lösung.

Dieses Maximum der Dipeptidase-aktivität verschiebt sich nun mit steigender HCN-Konzentration nach höheren $Zn^{\cdot\cdot}$-Konzentrationen, fällt absolut dabei aber langsam ab. LINDERSTRØM-LANG nimmt zur Deutung dieser Erscheinungen an, daß Zn in sehr kleinen Konzentrationen aktivirend wirkt, weil es einen Hemmungskörper durch Komplexbildung beseitigt, während das freie Ion, das bei höheren Konzentrationen vorliegt, giftig ist.

Analog reagirt es mit HCN unter Bildung eines Zinktetracyanid-ions $Zn(CN)_4$, das wieder ohne Einfluß ist, während freie Zn-ionen oder freies HCN im Überschuß ihre Giftwirkung entfalten können und ebenso die geringen, aber mit steigender Gesamt-konzentration zunehmenden $Zn^{\cdot\cdot}$- und CN'-mengen, die mit dem Komplex im Gleichgewicht stehen. Die Beziehungen zwischen Konzentrationen und Aktivität sind aber ziemlich komplicirt und es ist wohl möglich, daß sich noch weitere unbekannte Komplexe ausbilden. LINDERSTRØM-LANG sieht hiernach eine große Ähnlichkeit zwischen der Dipeptidase (I) und den Papainasen in ihrem Aktivirungsverhalten; der einzige Unterschied bestünde nur darin, daß Zn giftiger für Papainasen als für Peptidasen ist, während HCN umgekehrt wirkt.

Der natürliche Aktivator der katheptischen Enzyme, die **Zookinase**, wird beim Kathepsin behandelt werden. Sie ist nach WALDSCHMIDT-LEITZ **296)** identisch mit dem SH-Glutathion *). Die katheptische Carboxy-polypeptidase scheint aber im Gegensatz zur tryptischen (s. unten) ohne Aktivator (hier Zookinase oder Thiole)

*) Nach GRASSMANN (l. c. 229a, S. 98) ist die Kinase beim Papain nicht Glutathion, sondern ein Di-peptid aus Cystein + Glutaminsäure.

294) ***W. Graßmann***, Unters. über die Specif. proteol. Pflanzenenz. Habil. Schr. München 1929, S. 37, 93. — 295) ***K. Linderstrøm-Lang***, Antagonismus von Zn und HCN etc. Zs. phys. Chem., **224**, 121 (1934). — 296) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr, A. K. Balls***, Über den natürl. Aktivator der kathept. Enz. Naturw., **18**, 644 (1930). — 296a) ***M. Bergmann, J. S. Fruton***, New type of enz. in the intest. tract. Science (N. Y.) **1936 I**, 306; BPh **94**, 154.

unwirksam zu sein (WALDSCHMIDT-LEITZ c.s., l. c. 219). Der optimale ph der katheptischen Carboxy-polypeptidase (aus Milz) bei der Spaltung von Benzoyl-diglycin ist von der Art der Aktivirung (Zookinase, H_2S, HCN) unabhängig (l. c. 219). Durch Cystein und SH-Glutathion werden die Dipeptidase und die Amino-polypeptidase nach GRASSMANN c.s. **297)** schon bei mäßiger Konzentration des Cysteins völlig oder fast völlig gehemmt.

Im Papain wird die Papain-polypeptidase von BERGMANN (l. c. 158) durch Phenylhydrazin gehemmt und auch durch kleine Mengen Jod irreversibel geschädigt, während die Wirkung der Proteinase unverändert und durch HCN voll aktivirbar bleibt.

Über **Enterokinase** siehe §§ 530, 532. Die tryptische Carboxy-polypeptidase wirkt im Gegensatz zur Tryptase (s. § 530) bereits ohne Enterokinase (WALDSCHMIDT-LEITZ c.s., l. c. 219, S. 37, l. c. 221, LEBRETON **298)**, jedoch bewirkt die Enterokinase bei der Carboxy-polypeptidase nach WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 221) nicht nur eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch eine Erweiterung des relativen Specifitäts-bereiches (s. § 502). Protaminase wird durch Enterokinase nicht aktivirt **(299)**. Nach WEIL (l. c. 169, S. 297) trifft dies jedoch nur für ältere Präparate zu, während frisch dargestellte Protaminase-lösungen doch in geringem Ausmaß durch Enterokinase aktivirt werden. Über eine eventuelle Aktivirung der Acylasen ist noch nichts bekannt. Die katheptische Carboxy-polypeptidase wird durch Enterokinase gleichfalls nicht aktivirt (WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 219, S. 37), ebensowenig die ereptischen Enzyme.

Hemmung durch Spaltprodukte und Substrate. Wie bereits im H.W. S. 868 betont wurde, wird die Peptidspaltung stets durch alle in der Natur vorkommenden und nach den Untersuchungen von ABDERHALDEN c.s. (l.c. 277, 288, 289) auch durch zahlreiche nicht natürliche Aminosäuren und Amine gehemmt. Es handelt sich hierbei jedoch um unspecifische Hemmungserscheinungen, die daher bereits § 500 besprochen worden sind. Eine specifische Hemmung in dem Sinne, wie sie bei den Carbohydrasen vielfach beobachtet wird und dort wesentlich zur Specifitäts-bestimmung herangezogen wurde (s. § 299), ist bei den Peptidasen bisher nicht bekannt.

Ein solcher Fall ist vielleicht die von v. EULER c.s. **300)** beobachtete Hemmung der Dipeptidase (Leucyl-glycin) durch Glycyl-glycin, die von diesen Autoren als Argument gegen die Annahme zweier Dipeptidasen von LINDERSTRØM-LANG und SATO (s. § 501) angesehen wird; vgl. jedoch SATO **301)**. Andererseits wird von GRASSMANN und KLENK (l. c. 188) eine bevorzugte Hemmung der Spaltung von Peptiden, in denen die freie Aminogruppe dem Glycyl-rest angehört, bei der Spaltung durch Dipeptidase, aber auch durch Amino-polypeptidase beobachtet. Diese Erscheinung wird von GRASSMANN auf eine geringere Affinität der Dipeptidase (aber auch der Amino-polypeptidase) zu den Glycin-peptiden als zu den Leucin-peptiden bezogen. Hierfür spricht auch die rasch bis zu Ende verlaufende Spaltung des Leucyl-glycins, während die Spaltungs-geschwindigkeit des Glycyl-glycins im Laufe des Versuches infolge der Hemmung durch die Spaltprodukte abnimmt. Ebenso kommt auch die Spaltung der Tetrapeptide Leucyl-diglycyl-glycin und Triglycyl-glycin nach Abspaltung einer Aminosäure infolge der Hemmung der weiteren Spaltung des Diglycyl-glycins durch die freigesetzte Aminosäure nach GRASSMANN (l. c. 258, S. 22) zum Stillstand, während die Spaltung von Tri- und Tetrapeptiden mit freiem Leucyl-rest ungehemmt weitergeht (l. c. 258, S. 66, l. c. 294, S. 92). In gleicher Richtung liegen auch die Befunde van LINDERSTRØM-LANG (l. c. 239), der bei der Spaltung von Alanyl-glycin durch Darm-dipeptidase eine Hemmung durch Leucyl-glycin fand.

Diese Untersuchungen sind neuerdings von GRASSMANN c.s. **302)** erweitert und durch

---

297) ***W. Graßmann, H. Dyckerhoff, O. v. Schoenebeck,*** Natürl. Aktivatoren etc. Zs. phys. Chem., **186**, 183 (1930). — 298) ***E. Lebreton, F. Mocoroa,*** Nombre et nat. des ferm. protéol. du suc pancreat. C. R., **192**, 1492 (1931). — 299) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. Kofranyi,*** Darst. von Protaminase. Zs. phys. Chem., **222**, 148 (1933). S.A. — 300) ***H. v. Euler, S. Myrbäck, K. Myrbäck,*** Specif. enz. Dipeptidspalt. Ber. Chem. Ges., **62**, 2194 (1929). — 301) ***M. Sato,*** On the peptidases of green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **19**, Nr. 1, S. 4 (1931). S.A.

Affinitäts-messungen ergänzt worden. Hiernach nimmt die Affinität der Dipeptidase (s. auch § 501) zu den Substraten Leucyl-glycin > Alanyl-glycin > Glycyl-glycin in der gegebenen Reihe ab; entsprechend steigt die Hemmung durch (beliebige) Aminosäuren für Hefe- und Nieren-dipeptidase in der Reihe Leucyl-glycin < Alanyl-glycin < Glycyl-glycin an. Die hierbei zum Ausdruck kommende Zunahme der Affinität der Dipeptidase mit steigender Kettenlänge des die Aminogruppe tragenden Peptid-bausteins zeigt sich aber auch bei Hemmung durch die einzelnen Monoamino-carbonsäuren, die bei beiden untersuchten Dipeptidase-präparaten in der Reihe Glycin < Alanin < Valin < Leucin für alle drei untersuchten Substrate ansteigt.

Als eine Hemmungserscheinung bezw. Beseitigung von Hemmungen ist wohl auch die von ABDERHALDEN und v. EHRENWALL **303)** aufgefundene **Hervorrufung ereptischer Wirkungen** in „erepsinfreien Trypsin-lösungen" aufzufassen. Sie beobachteten, daß erepsinfreie Trypsin-lösungen nach längerem Stehen wieder Dipeptide spalteten, und zwar trat diese Erscheinung nur beim längeren Stehen glycerol-haltiger Enzym-lösungen ein. Das Wiederauftreten der dipeptid-spaltenden Wirkung erfolgte am leichtesten bei ph = 7,0 und höherer Temperatur (37°). Die Trypsin-wirkung gegen Casein blieb aber bei allen Operationen in vollem Umfang erhalten.

Durch Zusatz erepsinfreier Trypsin-lösung sowohl als auch durch solche Lösungen, die vorher durch Erhitzen auf 52° bis 56° vollständig inaktivirt waren, wurde die Dipeptidspaltung zunächst restlos gehemmt, trat aber nach längerem Stehen mit Glycerol bei 37° wieder auf. ABDERHALDEN nimmt demnach an, daß die (bei ph = 7 in Glycerol stabile, s. oben) Dipeptidase in diesen Lösungen durch einen Autolyse-vorgang freigesetzt wird. Werden die Lösungen jetzt einer erneuten Adsorption mit Tonerde Cγ unterworfen, so können Trypsin-lösungen erhalten werden, die auch nach längerem Stehen mit Glycerol keine Dipeptide mehr spalten, wohl aber noch (in einigen Fällen) das Tripeptid Glycyl-d,l-leucyl-glycin, also Amino-polypeptidasen-wirkung zeigen. Doch nach Zusatz von Glycin und anderen Aminosäuren, aber auch verschiedenen Zuckerarten und anderen Substanzen tritt die dipeptidspaltende Wirkung wieder auf.

Die von ABDERHALDEN c.s. **303)** (l. c. 278) beobachtete Spaltung von Chloracetyl-alanin und -leucin durch Erepsin-präparate, die vielleicht gleichfalls derartigen Erscheinungen zuzuschreiben ist, kann wohl eher als die Wirkung einer „Acylase" im Erepsin aufgefaßt werden; s. auch ABDERHALDEN (l. c. 277) und § 502.

Schlangengift wirkt nach TSUCHIYA **304)** als spezifischer Aktivator der Dipeptidase, gleich welcher Herkunft. TSUCHIYA konnte den Activator durch Adsorption isoliren und die quantitativen Verhältnisse (Einfluß der Enzym-, Substrat- und Activator-konzentration) eingehend untersuchen.

Die Dipeptidasen I und II nach der Definition von LINDERSTRØM-LANG und SATO (l. c. 202) sollen durch den Activator aus dem Sekret verschiedener Schlangen verschieden beeinflußt werden. Sekret aus *Trimeresurus mucrosquamatus Cantor, T. gramineus Shaw,* und *Agkistrodon acutus Günther* aktivirt die Spaltung von Leucyl-glycin, nicht oder kaum die von Alanyl-glycin; Sekret von *Bungarus multicinctus Blyth* wirkt umgekehrt und das von *Naja naja Cantor* garnicht.

IV. Wirkungen der Peptidasen.

§ 501. Abweichend von der Disposition des H.W. haben wir alles Principielle über die Wirkungen der Peptidasen, sowie die Theorien ihrer Angriffsweise bereits im Zusammenhang bei den „Fermentwirkungen im Abbau" §§ 479a, 480 auseinandergesetzt. Hier sei nur noch einmal kurz zusammengefaßt: Peptidasen spalten die Peptidbindung — OC-NH — in allen natürlichen und synthetischen Peptiden geeigneter Konfiguration, sowie peptidähnlichen Stoffen (Peptid-ester, -amiden etc.) und teilweise in Peptonen, Protaminen und Histonen, nicht aber in Proteinen. Die Substrate werden stets vom Ketten-ende her angegriffen. Ansatzpunkt für die Peptidase ist je nachdem die freie Amino-, Imino- oder Carboxyl-gruppe. Außerdem besteht eine Specifizirung nach der Kettenlänge in Di- und Polypeptidasen. Diese Specifität der Peptidasen nach ver-

302) ***W. Graßmann, L. Klenk, T. Peters-Mayr,*** Z. K. des Affinitätsverh. tier. und pflanzl. Dipeptidase. Bioch. Zs., **280**, 307 (1935). — 303) ***E. Abderhalden, E. v. Ehrenwall,*** Z. Frage der Einheitl. des Erepsins. Fermentforsch., **12**, 224, 411, **13**, 47, 262, **14**, 1, 118 (1930/33). S.A. — 304) ***Y. Tsuchiya,*** Enz. chem. invest. of Formosan snake venoms I bis VII. Mem. Fac. Sci. Taihoku Imp. Univ. **9**, Nr. 5, S. 137, 161, 179, Nr. 7, S. 277, 291, 309, 325 (1936); Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **11**, 135 (1935). S.A.

schiedenen Gruppen und demnach die Spaltbarkeit der einzelnen Substrate durch die verschiedenen Enzyme werden wir § 502 behandeln.

Mitogenetische Strahlung tritt nach BILLING c.s. **306)** bei der Erepsin-wirkung in gleicher Weise wie bei der Pepsin-wirkung auf.

1) Kinetik der Wirkungen.

Die Kinetik der Peptidasen ist noch weitgehend ungeklärt, da die quantitativen Messungen der v. EULER'schen Schule noch mit wenig gereinigten und demnach uneinheitlichen Enzymlösungen angestellt wurden und die reinen, einheitlichen Enzymlösungen erst vor so kurzer Zeit dargestellt wurden, daß umfangreichere exakte Messungen ihrer Kinetik noch nicht vorliegen.

Abb. 67. Aktivitäts-p_S-Kurven der Nierendipeptidase nach **302)**.

Dipeptidase. Die Anfangs-geschwindigkeit bei der Spaltung von Leucyl-glycin, Alanyl-glycin und Glycyl-glycin steigt bei der Wirkung der Nieren-dipeptidase nach GRASSMANN c.s. **302)** mit der Substrat-konzentration bis zu 0,016 bezw. 0,128 bezw. 0,256 Mol/l, um dann (langsamer) wieder abzufallen. Für andere Enzym-präparate ergeben sich etwas andere Substrat-konzentrationen für v_{max}, jedoch bleibt die Form der Kurven und auch das Verhältnis der günstigsten Substrat-konzentrationen für die drei Peptide gewahrt. Die Aktivitäts-p_s-Kurven für diese drei Substrate gibt Abb. 67 von GRASSMAN c.s. **302)** wieder.

Da also keine wirkliche Konstanz der Reaktions-geschwindigkeit erreicht wird, weichen die Kurven auch von der theoretischen Dissoziationsrest-kurve ab; bis zum Maximum stimmt ihr Verlauf jedoch, wie auch aus der Figur ersichtlich ist, hinreichend mit der theoretischen überein, um sie als ungefähre Rechengrundlage zu benutzen. Aus diesen und den § 500 besprochenen Hemmungs-versuchen werden die Aktivitätskoeffizienten $K_H = \frac{K_s \cdot H}{S + K_s} \cdot \frac{v}{v_0 - v}$ berechnet, die mit den experimentell gefundenen Werten verhältnismäßig gut übereinstimmen; wenn sie natürlich auch von einem Enzym-präparat zum anderen ziemlich stark schwanken, so ist das relative Verhältnis für die drei Substrate doch annähernd gleichbleibend. Das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeiten der Glycyl-glycin- und der Leucyl-glycin-verbindungen des Fermentes Q_∞ ist für Hefe- und Nieren-dipeptidase annähernd das gleiche; Q_∞ ist kleiner als 1, so daß also die Leucyl-glycin-Ferment-verbindung langsamer zerfällt als die des Glycyl-glycins **(307)**.

Abb. 68. Spaltung von Glycyl-glycin durch Nieren-dipeptidase bei wechselnder Substratkonzentration nach **302)**.

Diese Schwankungen sind nicht als beweisend für die Störung der Kinetik und damit für die Existenz nicht-

306) ***E. Billing c.s.,*** Die spectr. Analyse der mitogenet. Strahlung etc. Arch. Biol. nauk, **35** B, 37 (1934); BPh **90,** 220. — 307) ***W. Graßmann, L. Klenk,*** Z. Frage der Einheitl. etc. (Peptidasen). Zs. phys. Chem., **186,** 26 (1929). S.A.

resistenter Hemmungsstoffe anzusehen (LINDERSTRØM-LANG, l. c. 134, S. 425, l. c. 239, SATO, l. c. 301, S. 4) und werden auch von GRASSMANN (l. c. 302, S. 310) nicht dafür angesprochen. Diese Annahme wurde von GRASSMANN **307)** (S. 47) vielmehr darauf gestützt, daß wäßrige Extrakte aus Malz, Hefe und Organen wesentlich geringere Affinität zu Glycyl-glycin als zu Leucyl-glycin besitzen, was bei Glycerolextrakten nicht in dem Masse der Fall war, während v. EULER c.s. **300)** aus ihren Versuchen auf eine Verschiedenheit von Malz- und Organ-dipeptidasen schlossen.

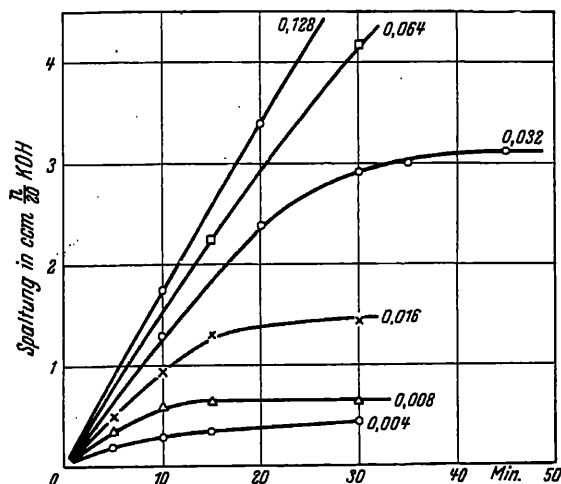



Abb. 69. Spaltung von Alanyl-glycin durch Nieren-dipeptidase bei wechselnder Substratkonzentration nach 302).

Entsprechend dieser Sachlage ist die Abhängigkeit der Reaktions-geschwindigkeit von der Substrat-konzentration noch wenig geklärt.

Sie ist wahrscheinlich je nach Art des Substrates verschieden, so daß eigentlich nicht von einer Kinetik der Dipeptidase schlechthin, sondern nur von einer solchen der Wirkung gegen ein bestimmtes Substrat die Rede sein kann. So ist die Reaktions-geschwindigkeit bei der Spaltung durch Hefe- und Nieren-dipeptidase von der Leucyl-glycin-konzentration nach GRASSMANN **302), 307)** „*in weiten Grenzen unabhängig*", während sie bei Glycyl-glycin und Alanyl-glycin mit der Substrat-konzentration ansteigt, wie deutlich aus den Abb. 68, 69, 70 nach **302)** hervorgeht; die Zahlen an den Kurven geben die Substrat-konzentrationen in Mol/l an. Auch v. EULER und JOSEPHSON (l. c. 237) finden geringen Anstieg mit der Glycyl-glycin-konzentration bei Spaltung durch Darm- und Hefe-erepsin, und ebenso WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 238), während dieser bei Glycyl-tyrosin wieder annähernde Unabhängigkeit von der Substrat-konzentration, bei Leucyl-glycin dagegen ziemlich raschen Anstieg fand. Ganz abweichend sind die älteren Befunde von LEVENE, SATO und NORTHROP.

Abb. 70. Spaltung von Leucyl-glycin durch Nieren-dipeptidase bei wechselnder Substratkonzentration nach 302).

LEVENE c.s. **308)** beobachteten sogar Abnahme der Reaktions-geschwindigkeit mit steigender Glycyl-glycin-konzentration. SATO **301)** findet bei der Spaltung mit Malz-dipeptidase ebenso wie WALDSCHMIDT-LEITZ starken Anstieg der Reaktions-geschwindigkeit mit der Leucyl-glycin-konzentration bis zum Maximum bei etwa 0,15 m, während die Reaktions-geschwindigkeit bei Alanyl-glycin von der Substrat-konzentration bis zu etwa 0,4 m

---

308) ***P. A. Levene, L. W. Bass, R. E. Steiger***, Rel. of chem. struct. to the rate of hydrol. of pept. IV. Jl. of Biol. Chem., **81**, 221 (1929). S.A. — 309) ***P. A. Levene, H. S. Simms***, Rel. of chem. struct. to the rate of hydrol. of pept. II, III. Jl. of Biol. Chem., **62**, 711, **70**, 253 (1924/26).

Abgeschlossen: 3. 8. 36. Ber. Phys. 94, H. 1/2.

nur gering abhängig war. NORTHROP und SIMMS (l. c. 227) finden wieder bei allen untersuchten Dipeptiden entsprechend dem von ihnen beobachteten monomolekularen Reaktions-verlauf in Bezug auf das Enzym (s. unten) Unabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substrat-konzentration.

Der Umsatz steigt mit der Zeit linear an, wie von LÜERS und MALSCH (l. c. 207) für die Spaltung von Leucyl-glycin durch Malz-dipeptidase, von WALDSCHMIDT-LEITZ und DEUTSCH (l. c. 240) für Milz-dipeptidase und von MANSOUR-BEK (l. c. 194) für das Enzym aus *Murex* gefunden wurde.

Dieser lineare Anstieg des Umsatzes mit der Zeit konnte von GRASSMANN **307**) und SATO (l. c. 301) für die Spaltung von Leucyl- und Alanyl-glycin durch Malz-, Hefe- und Nieren-dipeptidase nur teilweise (bei geringen Substrat-konzz.) bestätigt werden, während der Umsatz bei Glycyl-glycin (infolge der Hemmung durch die Spaltprodukte) mit der Zeit langsamer wird.

Für die Abhängigkeit der Reaktions-geschwindigkeit von der Enzym-konzentration fanden LÜERS und MALSCH (l. c. 207) bei Leucyl-glycin Proportionalität zwischen Umsatz und Enzym-konzentration, ebenso LINDERSTRØM-LANG (l. c. 239) bei Alanyl-glycin und Darm-dipeptidase und MANSOUR-BEK (l. c. 193, 194) bei Glycyl-glycin und Dipeptidase aus *Maja* und *Murex*. Demgegenüber beobachteten v. EULER und JOSEPHSON (l. c. 237) bei der Spaltung von Glycyl-glycin durch Darm- und Hefe-erepsin einen streng monomolekularen Reaktions-verlauf in Bezug auf das Enzym und ebenso WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 151, S. 261, l. c. 161, S. 294, l. c. 166, S. 39, l. c. 238) für Leucyl-glycin, Alanyl-glycin, Glycyl-glycin und Glycyl-tyrosin bei Spaltung mit Pankreas- und Darm-dipeptidase: die Enzym-menge ist der Reaktions-geschwindigkeit direkt und den Zeiten gleichen Umsatzes umgekehrt proportional.

Das gleiche finden LEVENE c.s. **308**) **309**) für alle untersuchten Dipeptide der natürlichen Konfiguration und NORTHROP und SIMMS (l. c. 227) für Glycyl-glycin, Glycyl-leucin, Glycyl-asparagin, Glycyl-asparaginsäure und die Biuret-base, nur bei Glycyl-alanin wurde ein Abfall der Konstante im Verlauf der Reaktion beobachtet. GRASSMANN (l. c. 181) gibt dagegen an, daß die Spaltung von Leucyl-glycin durch Hefe-dipeptidase nur annähernd monomolekular verläuft und der Verlauf nach der 1. Ordnung auch nur bei nicht zu hohen Enzym-konzentrationen erhalten wird; ebenso LINDERSTRØM-LANG (l. c. 235, S. 171) für Darm-dipeptidase. MILL und LINDERSTRØM-LANG (l. c. 250) finden bei der Spaltung von Leucyl-glycin durch Malz-dipeptidase sogar einen starken Abfall der monomolekularen Reaktions-konstante, den sie zum Teil der hemmenden Wirkung des Phosphat-puffers zuschreiben. Den Abfall der monomolekularen Konstante bei der Glycyl-glycinspaltung durch Darm-dipeptidase führt LINDERSTRØM-LANG (l. c. 235, S. 171) auf Hemmung durch Spalt-produkte und Selbstzerstörung des Enzyms zurück.

Der Endwert der Spaltung ist fast stets 100 % mit Ausnahme der von Glycyl-glycin (s. besonders GRASSMANN **302**)). Bei einem Überschuß an Enzym verläuft die Spaltung nach NORTHROP und SIMMS (l. c. 227) vollständig; bestätigt nunmehr von LEVENE und SIMMS **308**) unter Richtigstellung ihrer älteren Deutung (**309**)).

Auch die Spaltung von β-Naphthalinsulfoglycyl-glycin durch die Sulfopeptidase aus *Aspergillus niger* geht nach H. OTANI (l. c. 265) bei 37° nach 72^h bis 99,6 % (20^h: 79 %, 48^h: 94 %).

Amino-polypeptidase. Die Spaltung von Tripeptiden wie Leucyl-diglycin durch die Amino-polypeptidase des Darmes ist nach BALLS und WALDSCHMIDT-LEITZ **310**) eine monomolekulare Reaktion in Bezug auf das Enzym; der Substrat-konzentration ist die Reaktions-konstante in weiten Grenzen proportional, während bei dem Milz-enzym von WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 219) linearer Reaktions-verlauf (Proportionalität der Reaktionsgeschwindigkeit mit der

310) ***A. K. Balls, E. Waldschmidt-Leitz,*** Concerning animal dipeptidase and polypeptidase. Amer. Jl. of Phys., **90**, 272 (1929).

Enzym-konzentration) beobachtet wurde. MANSOUR-BEK (l. c. 194, S. 351, l. c. 193, S. 175) fand dagegen für die Amino-polypeptidase aus Wirbellosen bei der Spaltung von Leucyl-diglycin bis zu 60 % Spaltung direkte Proportionalität zwischen Umsatz und Enzym-menge.

Tryptische Carboxy-polypeptidase. Die Hydrolyse des Chloracetyl-l-tyrosins zeigt nach WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR (l. c. 221) monomolekularen Reaktionsverlauf in Bezug auf das Enzym. Außerdem sind in gewissen Grenzen die Enzym-mengen den Zeiten gleichen Umsatzes umgekehrt, den Reaktions-konstanten direkt proportional.

Die Messungen des Reaktions-verlaufes bei der Spaltung von Chloracetyl-l-tyrosin durch Carboxy-polypeptidase aus *Maja* und *Murex* von MANSOUR-BEK (l. c. 193, 194, S. 350) lassen keine eindeutige Gesetzmäßigkeit erkennen: der Umsatz ist nur bis zu etwa 60 % Spaltung der Enzym-konzentration proportional und wächst dann langsamer; er ist etwa der Wurzel aus der Zeit proportional.

Protaminase. Bei der Spaltung des sauren Protons konnte WEIL (l. c. 169) keine exakte Gesetzmäßigkeit feststellen: der Umsatz steigt erst rasch, dann langsam mit der Zeit an; in ähnlichen Verhältnissen steht er zur Enzym-konzentration und strebt auch hier einer Konstanz bei weiter steigender Enzym-konzentration zu.

Katheptische Carboxy-polypeptidase. Bei der Spaltung von Benzoyl-diglycin durch die Carboxy-polypeptidase der Milz ist nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 219, S. 24) der Umsatz der Zeit und der Enzym-konzentration annähernd proportional.

Versuche zur Kinetik der Peptidspaltung durch verschiedene Adsorbate und Eluate sind von FODOR 311) angestellt worden.

2) Affinitäts-Verhältnisse.

Die qualitative Affinität zu den einzelnen Substraten, also die Spaltbarkeit oder Unspaltbarkeit eines bestimmten Substrates kommt durch die (absolute) Specifität der Enzyme zum Ausdruck. Die quantitative Affinität, also die relative Specifität der Peptidasen ist bisher noch kaum einwandfrei untersucht. Es liegen zwar bereits eine ganze Anzahl von Affinitäts-messungen vor; jedoch leiden diese alle an der bisher noch mangelhaft aufgeklärten Kinetik der Peptidasen.

Die einzig sicheren Angaben scheinen die von GRASSMANN c.s. (l. c. 185, 302, 307) zu sein, die in ihrem wesentlichen Inhalt von LINDERSTRØM-LANG und SATO (l. c. 234, 239, 301), WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 151, 238) und von v. EULER c.s. (l. c. 300) bestätigt wurden.

Hiernach nimmt die Affinität der Dipeptidase und im Wesentlichen wohl auch die der Amino-polypeptidase zur Aminosäure in der Reihe der aliphatischen Monocarbonsäuren mit steigender Kettenlänge zu; das gleiche gilt auch für die im Peptid gebundene Aminosäure, wenn sie in diesem der Träger der Aminogruppe ist, so daß also z.B. die Affinität der Dipeptidase in der Reihe Glycyl-glycin < Alanyl-glycin < Leucyl-glycin zunimmt. Dieselbe Regel scheint für die Dipeptidase auch bezüglich des Trägers der Carboxylgruppe zu gelten, also die Spaltung in der Reihe Glycyl-glycin < Glycyl-alanin < Glycyl-leucin zuzunehmen; jedoch ist dies bisher weniger sicher (l. c. 302). Nur in der Art der Deutung dieser Befunde gehen die Ansichten von GRASSMANN und LINDERSTRØM-LANG auseinander, indem eben LINDERSTRØM-LANG (l. c. 239) annimmt, daß der so große Affinitäts-unterschied bei der Dipeptidase für die Existenz zweier verschiedener Enzyme spricht, während GRASSMANN nur eine Dipeptidase mit verschieden großer relativer Affinität zu verschiedenen Substraten gelten läßt.

Für eine Reihe von Peptiden haben außerdem LEVENE c.s. (l. c. 308) die monomolekularen Konstanten der Reaktions-geschwindigkeit bestimmt und zusammengestellt; hiernach ergibt sich aus den unter gleichen Bedingungen ausgeführten Bestimmungen folgende (mit der oben besprochenen übereinstimmende) Reihe zunehmender Affinität: Glycyl-d,l-phenyl-alanin, Glycyl-d-valin, Glycyl-glycin, Glycyl-l-leucin, Glycyl-d,l-alanin, Glycyl-d,l-phenylaminoessigsäure, d,l-Alanyl-glycin, d-Alanyl-d-alanin.

---

311) ***A. Fodor, Ch. Epstein,*** Z. Kinetik der Peptidspalt. durch Ferm. der Hefe. Kolloid-Zs., **37**, 168 (1925).

3) Einheiten.

Dipeptidase. Wohl die älteste Peptidasen-einheit ist die „Erepsin-einheit" von WILLSTÄTTER und GRASSMANN (l. c. 242); es ist dies diejenige Dipeptidasen-menge (Di.-E.), die bei ph = 7,8 die vorhandene Menge eines Peptids in einer Stunde zur Hälfte spaltet; nach GRASSMANN (l. c. 181) wird von 0,225 g (= $^6/_5$ Millimol) d,l-Leucyl-glycin ausgegangen, die in einem Gesamtvolumen von 10 cm³ bei 40° gespalten werden. Unter diesen Bedingungen entspricht 1 **(Di.-E.)** 1,5 cm³ n/5 KOH nach 60′ Reaktionszeit. Eichkurven für 15′, 30′ und 60′ werden von GRASSMANN (l. c. 181) abgebildet. Diese Definition hat sich als Dipeptidase-einheit bewährt. Zur Bestimmung der Einheit der Malz-dipeptidase nach der Leucyl-glycin-spaltung geben LINDERSTRØM-LANG und SATO (l. c. 249, S. 13) eine empirische Eichkurve.

Für die Dipeptidase der Milz definirten WALDSCHMIDT-LEITZ und DEUTSCH (l. c. 240) die „Lieno-Erepsin-einheit" (L.-Er.-E.) gleich der Enzym-menge, die 0,001 Mol d,l-Leucyl-glycin bei ph = 8,0 in 1′ zu 20 % hydrolisirt, d. h. der Quotient aus Umsatz (cm³ 0,2 n-Lauge) und Zeit in Minuten ist = 1,0. 1(L.-Er.-E.) ist beispielsweise in 100 cm³ normalen Glycerol-auszuges aus frischer Milz (1 : 2) enthalten; die analytischen Grundlagen konnten von WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 219, S. 29) bestätigt werden.

Für die Dipeptidase aus *Maja* setzte MANSOUR-BEK (l. c. 193) als vorläufige Einheit diejenige Enzym-menge fest, die aus 2,64 mg Glycyl-glycin in 0,5 cm³ Lösung vom ph = 8,4 bei 30° in 6ʰ eine Spaltung entsprechend 1,67 cm³ n/100 KOH bewirkt; sie ist in 0,05 cm³ Rohextrakt vorhanden; der Quotient aus Umsatz und Zeit ist hiernach 0,0046. Sie wird nach den neueren Untersuchungen (l. c. 194) an *Murex* ersetzt durch die Menge, die den Quotienten 0,0055 ergibt, also unter den gegebenen Bedingungen einer Aciditäts-zunahme von 0,99 cm³ n/100 KOH entspricht. Diese Einheit ist in 0,05 cm³ Rohextrakt von *Murex* enthalten, während sich in 0,05 cm³ Rohextrakt aus *Maja* demnach 0,84 endgültige Dipeptidase-einheiten befinden.

Amino-polypeptidase. Einheit der Amino-polypeptidase **(PoE.)** ist nach GRASSMANN c.s. (l. c. 154, S. 73, l. c. 186, S. 64, l. c. 229, S. 219, Anm. 1) das Fünffache derjenigen Enzymmenge, die in einer Stunde bei 40° 0,049 g d,l-Leucyl-diglycin zu 50 % in Leucin und Diglycin spaltet; nach l. c. 181 die Hälfte der vorhandenen l-Peptidmenge bei ph = 7,0 in Gegenwart von m/30 Phosphat- und m/25 NH_4Cl-puffer. Als Polypeptidase-wert **PoW.** wird dann die Anzahl PoE. in 10 mg Trockensubstanz bezeichnet.

Als vorläufige Einheit der Amino-polypeptidase aus Organen definiren WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 219) das Tausendfache derjenigen Enzym-menge, für welche sich unter den folgenden Bedingungen der Quotient aus Umsatz (cm³ 0,2 n-COOH) und Reaktionsdauer (in Minuten) zu 0,001 ergibt. 0,244 g d,l-Leucyl-diglycin werden in 5,00 cm³ 0,2m-Na_2HPO_4 gelöst; nach Zusatz der Enzymprobe wird die Lösung mit 1n-NaOH auf ph = 8,0 und mit Wasser bezw. Glycerol auf 12 % Glycerol und 10 cm³ gebracht. Nach der bei 30° erfolgten Hydrolyse werden die COOH-Gruppen durch alkalimetrische Titration in 90 %iger methyl-alkoholischer Lösung und Thymolphthalein als Indikator gemessen (Leerbestimmung abziehen!).

Für die Amino-polypeptidase aus *Maja* wählt MANSOUR-BEK (l. c. 193) zur Einheit diejenige Enzym-menge, die bei 4,9 mg Leucyl-diglycin in 0,5 cm³ Lösung vom ph = 8,2 bei 30° in 6ʰ eine Spaltung entsprechend 1,10 cm³ n/100 KOH bewirkt; sie ist in 0,05 cm³ Rohextrakt vorhanden. Die *Murex*-einheit ist nach MANSOUR-BEK (l. c. 194, S. 351) mit der *Maja*-einheit identisch; in 0,05 cm³ Rohextrakt aus *Murex* befinden sich 1,2 Einheiten; unter den für *Maja* gegebenen Bedingungen ist bei der *Murex*-einheit der Quotient aus Umsatz (cm³ n/100 KOH) und Zeit (in Minuten) gleich 0,003.

Tryptische Carboxy-polypeptidase. Als Einheit der Carboxy-polypeptidase **(C.-Pol.-E.)** bezeichnen WALDSCHMIDT-LEITZ und PURR (l. c. 221) das Tausendfache derjenigen Enzymmenge, die unter folgenden Bedingungen die monomolekulare Konstante k = 0,001 der Reaktions-geschwindigkeit ergibt. Die 30′ mit Enterokinase bei 30° aktivirte und mit H_2O auf 2 cm³ aufgefüllte Enzym-probe wird zu 5 cm³ einer 0,04 m-Chloracetyl-l-tyrosin-lösung von ph = 7,4 gesetzt, bis zu 2ʰ im Thermostaten bei 30° belassen; dann wird der Zusatz an NH_2-Gruppen nach VAN SLYKE bestimmt.

Als Einheit der Carboxy-polypeptidase aus *Maja* nimmt MANSOUR-BEK (l. c. 193) die in 0,5 cm³ Rohextrakt vorhandene Enzym-menge an. Diese setzt aus 2,575 mg Chloracetyl-tyrosin in 0,5 cm³ Lösung vom ph = 6,2 bei 30° in 6ʰ eine 0,58 cm³ n/100 KOH entsprechende Menge Carboxyl-gruppen frei. Für *Murex* gelten nach MANSOUR-BEK (l. c. 194, S. 350) im Allgemeinen dieselben Bedingungen, nur daß die Einheit in 0,1 cm³ Rohextrakt vorhanden ist, und die bei dem optimalen ph = 7,6 durchzuführende Spaltung 0,60 cm³ n/100 KOH entsprechen muß.

Einheit der **Protaminase** ist nach WEIL (l. c. 169) diejenige Enzym-menge, die aus 0,1 mg sauren Protons (aus Clupein) in 10 cm³ Lösung vom ph = 8,0 bei 30° in 1h 1 cm³ N_2 (von 20° und 740 mm Hg, gemessen nach VAN SLYKE) freisetzt. Dieses Maß ist jedoch, wie WEIL selbst betont, nur bei kleinen Enzym-konzentrationen bis etwa zur dritten Einheit anwendbar, da die Spaltung bei höheren Enzym-konzentrationen kaum weiter ansteigt.

Als vorläufige Einheit der **katheptischen Carboxy-polypeptidase [kath.Pol.-(e.)]** definiren WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 219) das Hundertfache derjenigen Enzym-menge, die unter folgenden Bedingungen den Quotienten der gebildeten NH_2-Gruppen (cm³ 0,2 n) und der angewandten Zeit (in Stunden) gleich 0,01 ergibt. Die Enzymprobe wird durch Einleiten von H_2S (½h) bei neutraler Reaktion aktivirt, mit Wasser auf 7,5 cm³ verdünnt und mit 2,5 cm³ Benzoyl-diglycin-lösung (entsprechend 0,00025 Mol) vom ph = 4,2 12h bis 24h bei 30° im Thermostaten angesetzt und dann der Zuwachs an NH_2-Gruppen nach VAN SLYKE bestimmt.

V. Specifität der Peptidasen.

Vorbemerkung.

§ 502. Alles was über die Specifität der Peptidasen grundsätzlich zu sagen ist, ist anläßlich der Diskussion über die „Fermente im Abbau" §§ 478—480 gesagt worden. Aber dort sind naturgemäß, um nicht die Kontinuität zu zerstören, immer nur zu diesen principiellen Auseinandersetzungen einige wenige Beispiele für die Specifität der Peptidasen überhaupt und ihrer einzelnen Vertreter mitgeteilt worden; aus denselben Gründen sind auch die experimentell noch zweifelhaften Befunde dort nicht gegeben worden. Was hier also übrig bleibt, ist eine ganz summarische Zusammenstellung der gefundenen Tatsachen ohne jegliches Zurückgreifen auf die Theorie und die Bedeutung dieser Tatsachen. Es ist ferner nicht nötig, und auch aus Raumgründen kaum möglich, hier sämtliche überhaupt jemals untersuchten Stoffe peptidähnlicher Natur in ihrem enzymtypischen Verhalten aufzuzählen. Es wird dies für das vorliegende Werk noch dadurch erschwert, daß wir ja nicht vom Substrat ausgehen können, und sagen: dieser Körper wird von dem und dem Enzym gespalten, von den anderen nicht; wir müssen ja vom Enzym ausgehen und dessen Specifität schildern; wir müßten also eine ganze Reihe von Peptiden und dergl. mehrfach erwähnen. Es kommt ferner hinzu, daß ein großer Teil der älteren Arbeiten enzymtypisch sehr erheblich an Interesse verloren hat, auch solche aus der Periode, als man schon „Trypsin" und „Erepsin" zu trennen gelernt hatte. Aber in diesem „Trypsin" steckten immer noch die verschiedenen Carboxy-polypeptidasen und im Erepsin andere Specialfermente. Wir müssen also eine Auswahl treffen. Wir werden in der Hauptsache nur die Versuche hier wiedergeben, deren Ergebnisse eine gewisse theoretische Bedeutung haben; für die anderen muß ein für alle Mal auf die umfassende Zusammenstellung von GRASSMANN und MAYR **312)** verwiesen werden. Was seither neu hinzugekommen ist, werden wir hier referiren. Zur Einordnung dieser Tatsachen seien ganz kurz die Principien der specifischen Wirkungen wiederholt.

Specifitätsgrundlagen aller Peptidasen.

1) Die zu spaltenden Stoffe müssen offene Ketten geringer oder mittlerer Länge sein. Proteine mit längeren Ketten als einige Protamine werden von Peptidasen nicht angegriffen.
2) Die zu spaltenden Stoffe müssen die „Peptidbindung" haben, d. h. die Gruppe —CO—NH—.
3) Die specifische Angriffsgruppe muß in unmittelbarer Nachbarschaft dieser Peptidbindung stehen. Es kann sein ein Carboxyl, eine NH_2-Gruppe, eine heterocyclische > NH-Gruppe (Prolin), eine zweite Säureamidgruppe.
4) Die Körper müssen einen bestimmten sterischen Bau um die Peptidbindung herum haben. Diese Aussage tritt an die Stelle der früheren, daß nur Peptide aus

312) *W. Graßmann, O. Mayr*, Proteasen und -Amidasen. Tab. Biol. (W. JUNK) IX, 296 (1934).

l-Aminosäuren gespalten werden, die aus den optischen Antipoden nicht. In den allermeisten Fällen decken sich zwar diese beiden Aussagen, aber es gibt doch Fälle, in denen Derivate der d-Aminosäuren gespalten werden (§ 480).

Diese Bedingungen gelten für alle Peptidasen. Für die einzelnen Gruppen treten nun noch weitere Bedingungen hinzu, die eben ihre besondere Specifität erklären. Am schärfsten sind diese Bedingungen für die Dipeptidasen herausgearbeitet.

Peptid-anhydride werden nicht durch Peptidasen gespalten (WALDSCHMIDT-LEITZ **313**), KAWAI **314**)). Über die Spaltbarkeit einiger Peptid-anhydride durch Proteinasen s. MATSUI (l. c. 172, § 473). Neuerdings behauptet ODA **322a**) die Spaltbarkeit von Peptid-anhydriden durch Carboxy-polypeptidasen (?!), soweit die Substrate bei ph ~ 8 ionisirt sind. — Glykopeptide werden gleichfalls nicht angegriffen (BERGMANN **315**)).

Zu 4): Spaltung von Peptiden mit d-Aminosäuren. Diese erfolgt, wenn das „unnatürliche" Glied vom Spaltort bezw. dem Angriffspunkt der Peptidase weiter entfernt ist.

So erfolgt nach WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. (l. c. 175, S. 1210) **316**) **317**) die Hydrolyse des d,l-Leucyl-glycyl-l-tyrosins durch Amino-polypeptidase asymmetrisch unter Bildung von l-Leucin und Glycyl-l-tyrosin, da Amino-polypeptidase am Leucyl-Rest ansetzt, während Carboxy-polypeptidase symmetrisch unter Bildung von d,l-Leucyl-glycin und l-Tyrosin spaltet, da diese am Tyrosin ansetzt und infolgedessen durch das **d**-Leucin nicht gestört wird. Spaltung von d-Leucyl-glycyl-l-leucin durch Carboxy-polypeptidase, aber nicht durch Amino-polypeptidase (Erepsin) s. auch ABDERHALDEN und SCHWAB **318**) **319**). Dagegen wird z. B. wieder Glycyl-l-leucyl-glycyl-**d**-leucin durch Amino-polypeptidase gespalten (**320**).

Außerdem sind Dipeptide mit optischen Antipoden spaltbar, wenn durch deren Reste keine sterische Hinderung des Enzyms bewirkt wird (s. unten Punkt 5). Sonst werden stets nur Peptide mit „natürlichen" Aminosäure-bausteinen angegriffen (ABDERHALDEN **321**)).

a) Specifität der Dipeptidasen.

BERGMANN **322**) stellt folgende fünf Bedingungen auf:

1) Eine freie NH_2-Gruppe in unmittelbarer Nachbarschaft, d. h. am nächsten C-Atom neben der Peptidbindung.
2) Eine freie COOH-Gruppe in unmittelbarer Nachbarschaft.
3) Ein freies H an der Peptidbindung selbst (Peptidwasserstoff).
4) An den beiden der Peptidbindung benachbarten C (α und α') muß je mindestens ein freies H stehen.
5) Der sterische Bau muß derart sein, daß diese beiden H räumlich auf einer Seite, die „Seitenketten" R und R' auf der anderen Seite stehen, wenn diese größer als CH_3 sind (l. c. 333).

---

313) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.***, Spezif. von Pankr.-tryps. und Darm-erepsin. Ber. Chem. Ges., **61**, 299 (1928). — 314) ***T. Kawai***, Wirk. des Erepsins etc. Acta Scholae med. Kyoto, **11**, 131 (1928); BPh **50**, 115. — 315) ***M. Bergmann***, Synth. und Enzymvers. im Eiweißgeb. Klin. Ws., **11**, 1569 (1932). S.A. — 316) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls***, Z. Frage nach den Ursachen ster. Auslese durch Enz. Ber. Chem. Ges., **64**, 45 (1931). S.A. — 317) ***E. Waldschmidt-Leitz, H. Schlatter***, Stereochem. Spez. proteol. Enz. Naturw., **16**, 1026 (1928). S.A. — 318) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Z. Frage der spezif. Wirk. von Erepsin und Trypsin-kinase. Fermentforsch., **10**, 179 (1928). S.A. — 319) ***E. Abderhalden, E. Schwab***, Beziehungen zwischen Substrat und Ferm.-komplex etc. Fermentforsch., **10**, 305 (314) (1928). S.A. — 320) ***E. Abderhalden, H. Mayer***, Einfl. von „fremdartigen" Bausteinen (Proteasen) etc. Fermentforsch., **11**, 143 (1930). S.A. — 321) ***E. Abderhalden, W. Singer***, Asymmetr. Spalt. von Polypept. mittels Ferm. Fermentforsch., **8**, 187 (1925). — 322) ***M. Bergmann***, Rec. res. in the field of proteins and proteol. enz. Jl. Amer. Leather Chem. Ass., **29**, 353 (1934). S.A. — 322a) ***T. Oda***, Alkalihydrol. von Diketopip. und Anilinpept., sowie deren Dissoz.-Konst. Jl. of Biochem., **23**, 241 (1936); Chem. C. **1936 II**, 803.

Die Art der Seitenketten ist dann für die absolute Specifität ohne Bedeutung, wohl aber spielt sie für die relative Specifität eine wesentliche Rolle (GRASSMANN, l. c. 302; s. auch § 501).

Wir behandeln demnach hier die Dipeptidase als ein einheitliches Enzym. Was für und gegen die Annahme von LINDERSTRØM-LANG und SATO (l. c. 202, 203, 209, 248), HUSFELDT (l. c. 252) von der Existenz zweier verschiedener specifisch auf Leucin- bezw. Glycin-Peptide eingestellter Dipeptidasen an Tatsachen aufzuführen ist, haben wir bereits in den vorstehenden §§ 498—501 mitgeteilt.

Hinzuzufügen ist hier noch, daß LINDERSTRØM-LANG (l. c. 343) der Dipeptidase II auch die Wirkung auf Decarboxy-peptide zuschreibt (s. u.) womit diese Dipeptidase II wieder aus dem Rahmen der normalen Dipeptidasen herausfallen und ein Sonderenzym darstellen würde. Es handelt sich aber wohl bei diesen beiden Dipeptidasen, wie wir schon § 501 in Übereinstimmung mit GRASSMANN (l. c. 302) ausführten, um ein Enzym mit relativ größerer Affinität zu Leucin- als zu Glycin- (und allerdings auch Alanin-)-peptiden. Es sei hier nur noch einmal betont, daß alle Glycin-peptide eine relativ größere Ferment-resistenz zeigen, die wohl in der kurzen Kette des Glycins ohne Seitenketten begründet ist (s. auch unten bei Amino-polypeptidase). Es findet also keine Änderung der absoluten Specifität durch eine Substitution des einen H durch eine Seitenkette statt. Hierher gehört auch die Beobachtung von GRASSMANN und BAYERLE (l. c. 329), sowie von NAKASHIMA (l. c. 266) und SUZUKI **323**), daß die Peptide des Asparagins rascher gespalten werden als die der Asparaginsäure. Besonders bei den letzteren wurde auch eine Änderung der Affinität mit der Herkunft des Ferments beobachtet. So finden GRASSMANN und SCHNEIDER (l. c. 331) eine Zunahme der Spaltbarkeit von l-Asparagyl-α-glycin für die Dipeptidase aus Hefe $<$ Darmschleimhaut $<$ Niere (vgl. auch § 509). Ähnlich ist auch das Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeiten für Leucyl-glycin und Alanyl-glycin vielfach von der Herkunft des Fermentes abhängig, so bei der keimenden Gerste (LINDERSTRØM-LANG und HOLTER **324**)), bei Nieren- und Hefe-dipeptidase jedoch gleich (GRASSMANN, l. c. 307); vgl. auch §§ 501 und 515. — Auch der noch 1929 von BALLS und WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 310) gemachte Unterschied zwischen einer pflanzlichen Dipeptidase, die die 2. Forderung braucht, und einer tierischen Dipeptidase, für die Punkt 2) nicht unbedingt erforderlich sein sollte, ist inzwischen hinfällig geworden.

Die Punkte 1) und 2) zusammen ergeben zunächst mal die Forderung, daß es sich um Dipeptide handeln muß, denn bei mehrgliedrigen Peptiden ist entweder 1) oder 2) nicht erfüllt. Alle Dipeptide, welche diese 5 Forderungen erfüllen, sind spaltbar, wenn auch mit sehr verschiedener Geschwindigkeit; eine Aufzählung ist also überflüssig. Es sind dies die echten Peptide, d. h. die beiderseitig aus l-Aminosäuren aufgebauten, und einige wenige, die nach 5) gebaut sind, aber optische Antipoden enthalten. Zum Teil sind aber solche abnorm gebauten Peptide nur der Carboxy-polypeptidase zugänglich, wie denn überhaupt hier Überschneidungen der specifischen Wirkungen vorkommen (s. Teil c)).

Für die Spaltbarkeit von Peptiden der Diaminosäuren durch Dipeptidase und Amino-polypeptidase gilt die allgemeine Regel, daß nur *„die durch α-Verknüpfung gebildeten Peptide spaltbar sind"* (GRASSMANN, l. c. 334), was faktisch mit der Forderung 1) zusammenfällt.

Ausnahmen betr. Gesamtspecifität. Es liegen einige Angaben vor, daß ganz normale Dipeptide durch Dipeptidase unspaltbar sind; es ist indessen fraglich, ob es sich nicht doch nur um die zweifellos vorhandenen erheblichen Verzögerungen handelt, die bei Dipeptiden mit besonderen Strukturen auftreten (s. unten):

Als unspaltbar angegeben: Glycyl-l-α-aminoisobuttersäure (ABDERHALDEN und ZEISSET, l. c. 345).

Langsam gespalten werden:

---

323) ***K. Suzuki,*** Konst. d. Polypept. und proteol. Ferm. Jl. of Biochem., **18,** 57 (1931). S.A. — 324) ***K. Linderstrøm-Lang, H. Holter,*** Peptidaseverteil. in Wurzel und Blattkeim des Malzk. Zs. phys. Chem., **204,** 15 (1932). S.A. — 324a) ***J. P. Greenstein,*** Stud. of multival. amino acids and pept. Jl. of Biol. Chem., **112,** 517 (1936); BPh **94,** 15.

l-Lysyl-l-asparaginsäure (BERGMANN c.s. 325), 326)) *).

l-Lysyl-l-glutaminsäure (RINKE 327), BERGMANN 326), 328)); desen Angriff ist nach GREENSTEIN 324a) durch ihren ziemlich starren, stabähnlichen Bau sehr erschwert.

Ausnahmen zu 1) scheint es nicht zu geben.

Wichtige Belege für 1): β-Asparagyl-tyrosin ist unspaltbar (BERGMANN 328), l. c. 201, § 476), ebenso β-Asparagyl-glycin (GRASSMANN c.s. 329), 330), 331)), während (331) die α-Verbindung natürlich spaltbar ist und auch aus dem Asparagyl-diglycin das eine (in α gebundene) Glycin abgespalten wird, während die β-Bindung unberührt bleibt. Das Gleiche gilt für d,l-Asparagyl-l-dialanin (329).

Analog verhalten sich die Glutamin-peptide. Das Tripeptid Glutathion = γ-Glutaminyl-cysteinyl-glycin ist nach GRASSMANN c.s. (l. c. 145, § 470) und ABDERHALDEN (l. c. 146, § 470) durch Dipeptidase und Aminopolypeptidase unspaltbar. — Ebenso ist d,l-Leucyl-γ-amino-buttersäure unspaltbar (ABDERHALDEN 332)).

Die Substitution der Aminogruppe verhindert den Angriff: Benzoyl-glycyl-glycin wird nicht gespalten (WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 358), ebensowenig N-Methyl-d,l-leucyl-glycin und Sarcosyl-l-tyrosin trotz des erhalten gebliebenen basischen Charakters der Aminogruppe (BERGMANN c.s. 333)), auch nicht andere Sarcosyl-peptide (ABDERHALDEN c.s., l. c. 360). Die Substitution entfernter Aminogruppen hat keinen Einfluß: d-(ε-benzoyl-lysyl)-d-glutaminsäure wird gespalten (RINKE 327)).

Specialenzyme zu 1). Die Forderung gilt nur für echte Dipeptidase, einige Specialenzyme spalten auch Stoffe ohne freies NH_2. Am wichtigsten ist die Prolyl-peptidase (**Prolinase** GRASSMANN's); spaltet zunächst die Prolyl-peptide selbst.

Prolyl-glycin, Prolyl-glycyl-glycin und andere (334), weitere Beispiele s. GRASSMANN und MAYR (l. c. 312). Die zunächst von ABDERHALDEN 335) bezweifelten Ergebnisse von GRASSMANN c.s. 336) sind später (337) von ihm bestätigt und erweitert worden; vgl. auch die Tabelle am Schluß des Kapitels.

Die **Sulfopeptidase** aus der Niere von OTANI 338) spaltet sulfonirte Glycyl-dipeptide, s. Tabelle. Die der Pilze ist nach H. OTANI 339) wohl mit dem Enzym der Niere identisch. MATSUMOTO 340) will auch Spaltung von β-Naphthalinsulfo-tri-glycin durch „Erepsin" (jedoch nicht von β-Naphthalinsulfo-di-glycin) beobachtet haben.

---

*) Wir schreiben hier die Aminosäuren stets genetisch, also alle natürlichen als „l", auch dann, wenn sie in den Originalarbeiten noch nach der effektiven Drehung, also „d-Lysyl-" u.s.w., bezeichnet sind. Wenn keine Bezeichnung hinzugefügt ist, sind stets die natürlichen, also l-Aminosäuren gemeint.

325) ***M. Bergmann, L. Zervas,*** Wirkungsw. und Spez. von Dipeptidase. Zs. phys. Chem., **224,** 11 (1934). S.A. — 326) ***M. Bergmann c.s.,*** Synth. von Dipeptidase des Lysins etc. Zs. phys. Chem., **224,** 26 (1934). S.A. — 327) ***Ch. G. H. Rinke,*** Z. K. proteol. Ferm. etc. Dissert. Leipzig 1934; BPh **84,** 651. — 328) ***M. Bergmann,*** Aufgab. der Synth. für die Erforsch. der Eiweißst. und ihrer Ferm. Naturw., **20,** 941 (1932). S.A.; Collegium **1932,** 751. S.A. — 329) ***W. Graßmann, H. Bayerle,*** Z. Spez. der Dipeptidase und Amino-polypeptidase. Bioch. Zs., **268,** 214 (1934). S.A. — 330) ***W. Graßmann, O. Mayr,*** Z. K. der Hefeasparaginase. Zs. phys. Chem., **214,** 185 (1933). — 331) ***W. Graßmann, F. Schneider,*** Z. Spez. der Dipeptidase. Bioch. Zs., **273,** 452 (1934). S.A. — 332) ***E. Abderhalden c.s.,*** Verh. von d, l-Leucyl-γ-aminobuttersäure geg. Hefemaz.-saft. Fermentforsch., **8,** 579 (1926). S.A. — 333) ***M. Bergmann c.s.,*** Spez. of dipeptidase. Jl. of Biol. Chem., **109,** 325 (1935). S.A. — 334) ***W. Graßmann,*** Neue Ergebn. auf dem Geb. der eiweißspalt. Enz. Collegium, **11,** 549 (1934). S.A. — 335) ***E. Abderhalden, O. Zumstein,*** Verh. von Prolin enth. Polypept. etc. Fermentforsch., **12,** 1, 341 (1930). S.A. — 336) ***W. Graßmann c.s.,*** Enzymat. Spaltbark. der Prolinpeptide. Ber. Chem. Ges., **62,** 1307 (1929); Zs. phys. Chem., **210,** 1 (1932). S.A. — 337) ***E. Abderhalden (H. Nienburg),*** Verh. von Prolinpept. etc. Fermentforsch., **13,** 573, **14,** 128 (1933). S.A. — 338) ***Sh. Otani,*** Über die Sulfopeptidase I, III, IV. Acta Scholae med. Kyoto, **17,** 163, 175, 182 (1934); BPh **85,** 165. — 339) ***H. Otani,*** Über die Sulfopeptidase der Pilze III. Acta Scholae med. Kyoto, **17,** 260 (1934); BPh **85,** 416. — 340) ***A. Matsumoto,*** Über die sulfon. Eiweißst. Acta Scholae med. Kyoto, **10,** 229 (1928); BPh **46,** 581.

Punkt 2). Die Frage, ob die **freie Carboxylgruppe** unbedingt nötig ist, ist noch sehr umstritten. Es werden zwar allerlei Stoffe gespalten, die das freie Carboxyl entbehren, weil es entweder garnicht vorhanden oder verestert oder amidirt ist; aber es sind vielleicht z. T. andere Specialenzyme tätig, die bei den Amiden und decarboxylirten Peptiden überleiten zu den Acylamidasen (vgl. S. 587). Außerdem steht die Frage offen, inwieweit Dipeptide mit abgeschirmter Carboxylgruppe nunmehr durch Amino-polypeptidase gespalten werden (s. Teil b)).

Bei den Hefepeptidasen scheint Punkt 2) stets notwendig zu sein, allerdings, nach GRASSMANN **340a)**, nicht in der strengen Formulirung von BERGMANN; die Carboxyl-gruppe kann weiter von der Peptid-bindung entfernt sein, da GRASSMANN c.s. **340a)** wiederholt eine Spaltung von (Glycyl-) Peptiden der Aminobenzoesäure durch Dipeptidase-präparate aus Hefe, die frei von Amino-polypeptidase waren, fanden.

Hierbei beobachteten sie jedoch in gewissem Gegensatz zu WALDSCHMIDT-LEITZ und BALLS (l. c. 316) keine qualitativen Unterschiede in der Spaltbarkeit, sondern nur quantitative in der Spaltungs-geschwindigkeit für Glycyl-o-, -m- und -p-Aminobenzoesäure. Auch ABDERHALDEN **341)** hatte d,l-Leucyl-p-aminobenzoesäure spaltbar gefunden. Dagegen liegen für Dipeptidase aus tierischen Geweben allerlei abweichende Befunde vor, wobei aber nicht stets klar ist, ob nicht Amino-polypeptidase im Spiel gewesen ist (s. Teil b)), besonders da ABDERHALDEN **342)** die beiden Dipeptide Glycyl- und Leucyl-d,l-ε-amino-n-heptylsäure, in denen also die Carboxylgruppe weit von der Peptidbindung entfernt war, unspaltbar fand.

Spaltung von **sogenannten Peptiden ohne Carboxylgruppe**, z.B. von aromatischen Basen.

Die von BALLS und KÖHLER (l. c. 356) gefundene Spaltbarkeit von Glycyl-p-aminobenzoesäure und -p-nitranilin ist nach BERGMANN c.s. (l. c. 333) der Amino-polypeptidase zuzuschreiben, die von BALLS und KÖHLER von der Dipeptidase in ihren Präparaten nicht absolut vollständig abgetrennt war, während GRASSMANN **340a)** wieder nur Spaltung durch Dipeptidase, aber nicht durch Amino-polypeptidase feststellen konnte, obwohl er ebenso wie BERGMANN mit reiner Hefe-dipeptidase arbeitete.

Diese Substrate und auch besonders Decarboxy-leucyl-glycin werden nach LINDERSTRØM-LANG **343)** durch ein besonderes Enzym gespalten, das von Amino-polypeptidase und Dipeptidase verschieden und nach seiner Meinung wahrscheinlich mit der von ihm angenommenen Dipeptidase II (s. oben und § 499), also der „Amino-leucyl-peptidase" identisch ist.

Zu **Punkt 3)** gibt es keine Ausnahmen. Für die Bedeutung des Peptidwasserstoffs bezw. seines sauren Charakters spricht nach BALLS und KÖHLER (l. c. 356) die Tatsache, daß Glycyl-anilin (im Gegensatz zu ABDERHALDEN **344)**) unspaltbar, Glycyl-p-nitranilin dagegen spaltbar ist.

Belege für Unspaltbarkeit am NH substituirter Dipeptide. Glycyl-sarcosin unspaltbar durch „Erepsin" (ABDERHALDEN c.s., l. c. 360, BERGMANN und ZERVAS, l. c. 325). Glycyl-l-prolin, l- und d-Alanyl-l-prolin und andere Prolin-peptide (BERGMANN, l. c. 129, 322, 325); für deren Spaltung ist wieder ein Sonderenzym, die **Prolin-peptidase** BERGMANN's (l. c. 129), verantwortlich, die mit der Amino-polypeptidase einhergeht, aber nach BERGMANN (l. c. 296a, im Gegensatz zu l. c. 322) nicht identisch ist.

340a) ***W. Graßmann c.s.***, Z. K. des Affinitätsverh. tier. und pflanzl. Dipeptidase. Bioch. Zs., **280**, 307 (315) (1935). S.A. — 341) ***E. Abderhalden, E. Riesz***, Vergl. Unters. etc. Fermentforsch., **12**, 180 (1930). S.A. — 342) ***E. Abderhalden, F. Broich***, Verh. von ε-Amino-n-heptylsäure . . . Dipept. geg. Trypsin und Erepsin. Fermentforsch., **14**, 115 (1933). S.A. — 343) ***K. Linderstrøm-Lang***, Cleav. of Leucyldecarboxyglycine by intest. erespsin. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **19**, Nr. 3 (1931). S.A. — 344) ***E. Abderhalden, H. Brockmann***, Z. Frage der die Hydrol. . . . einleitenden . . Bindungsart etc. Fermentforsch., **10**, 159 (1928).

Zu **Punkt 4)** ist festzustellen, daß ja, wie § 480 klargelegt wurde, die beiden α-H nur wegen ihres geringen Volumens erforderlich sind. Sie können daher durch kleine Substituenten wie z. B. CH_3 ersetzt werden, ohne daß die Spaltung verschwindet; sie wird nur verlangsamt.

Nach BERGMANN c.s. (l. c. 333) sind Glycyl- und l-Alanyl-aminoisobuttersäure, ebenso wie Aminoisobutyryl-glycin spaltbar, letzteres wegen der Nähe von CH_3 und NH_2 am geringsten, während ABDERHALDEN und ZEISSET **345)** nur für das erste Unspaltbarkeit, für die beiden anderen ebenso wie für zahlreiche andere Dipeptide der Aminoisobuttersäure dagegen Spaltbarkeit gefunden hatten. Nach BERGMANN und ZERVAS (l. c. 325) gilt dies nur für „Roherepsin", während reine Trockenpräparate von Hefe-Dipeptidase nur mit äußerst geringer Geschwindigkeit spalteten. LEVENE c.s. (l. c. 228) fanden gleichfalls Unspaltbarkeit von Glycyl-α-aminoisobuttersäure und Glycyl-d,l-phenylmethyl-aminoessigsäure.

Belege für Unspaltbarkeit am C substituirter Dipeptide. Ist der Substituent aber größer als CH_3, so wird die Spaltbarkeit aufgehoben (l. c. 333):

Glycyl-d-isovalin unspaltbar (LEVENE c.s., l. c. 308), ebenso Glycyl-d,l-isovalin (BERGMANN und ZERVAS, l. c. 325). d-Phenyl-alanyl-l-arginin wird im Gegensatz zu (**346**) nach (l. c. 325) gleichfalls nicht gespalten.

Wo scheinbare Ausnahmen vorliegen, handelt es sich um **Specialfermente**, z. B. die **Dehydro-peptidase** BERGMANN's **347—350)** (normalerweise nur in Niere, oder im gefaulten Pankreas und daher auch in einigen käuflichen Pankreatin-präparaten **347) 348)**).

Sie ist eine echte Peptidase, da direkt die Peptid-bindung CO—N gesprengt wird, wobei α-Ketosäure, NH_3 und Aminosäure (ohne Bildung von Amino-acyl-amiden als Zwischenprodukte, im Gegensatz zu (**348**)) entstehen (**349**).

Gespalten werden Glycyl-dehydro-alanin (**347**), **348**), Glycyl-dehydrophenylalanin, -dehydrophenylalanyl-glycin, -dehydro-phenylalanyl-d-glutaminsäure (**348**), **350**), jedoch nicht Acetylaminozimtsäure (**349**), und Chloracetyl-dehydrophenylalanin (**350**). Gegen diese Substrate verhalten sich die Präparate aus Niere und gefaultem Pankreas gleich (**349**).

Zu Punkt 5). Da es sich nach BERGMANN um eine rein „sterische Hinderung" handelt (§ 480), so sind hier quantitative Verschiebungen, d. h. Verlangsamungen bis zur völligen Hemmung ebenso wie bei Punkt 4) zu erwarten.

Belege für verzögerte Spaltung ungeeignet gebauter Dipeptide. Unspaltbar sind d-Leucyl-glycin (BERGMANN c.s., l. c. 333), d-Leucyl-l-asparagin (GRASSMANN und BAYERLE, l. c. 329), Glycyl-d-leucin (RONA und MARSSON **351**)).

Belege für Spaltung von Dipeptiden mit optischen Antipoden. l-Leucyl-d-alanin wird, wenn auch langsamer als l-Leucyl-l-alanin, gespalten und ebenso d-Alanyl-glycin (l. c. 333), ebenso d-Tyrosyl-arginin (l. c. 357).

b) Specifität der Amino-polypeptidasen.

Die Amino-polypeptidasen folgen den Dipeptidasen in Bezug auf 1), 4) und 5). 2) fällt ohne weiteres fort, da ja selbstverständlich das Carboxyl bei höheren Peptiden weiter entfernt ist. Im Gegenteil wirkt die unmittelbar benachbarte COOH-Gruppe

---

345) ***E. Abderhalden, W. Zeisset,*** Verh. von Polypept. mit α-Aminoisobuttersäure etc. Fermentforsch., **13**, 310 (1932). — 346) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein, A. Schäffner,*** Strukt. Voraussetzung. der spez. Spaltb. etc. Ber. Chem. Ges., **61**, 2092 (1928). — 347) ***M. Bergmann, K. Grafe,*** Synth. eines Peptids . . . Dehydroalanin aus Brenztraubensäure. Zs. phys. Chem., **187**, 187 (1930). — 348) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Enzymat. Spaltb. dehydr. Peptide. Zs. phys. Chem., **205**, 65 (1932). S.A.; ***H. Schleich,*** Eine neue Dipeptidase. Dissert. T. H. Dresden 1931. S.A. — 349) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Über Dehydropeptidase. Zs. phys. Chem., **207**, 235 (1932). S.A. — 350) ***M. Bergmann c.s.,*** Peptide dehydrirt. Aminosäuren etc. Zs. phys. Chem., **187**, 264 (1930). S.A. — 351) ***P. Rona, Th. Marsson,*** Erepsin. Bioch. Zs. **224**, 384 (396) (1930).

hemmend, und man kann sagen, daß deswegen Amino-polypeptidase normale Dipeptide nicht angreift; s. auch BALLS und WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 310).

In Bezug auf 3) herrscht insofern eine grundsätzliche Unklarheit *), als BERGMANN (l. c. 322) geneigt ist, seine Prolinpeptidase zu den Amino-polypeptidasen zu rechnen, hier also auf den Peptidwasserstoff zu verzichten. Er begründet die Specifität der Amino-polypeptidasen in anderer Weise (§ 480). Demgegenüber zeigten BALLS und KÖHLER **352)** durch Hemmungsversuche (§ 500), daß der Peptidwasserstoff für die Amino-polypeptidase die gleiche Bedeutung wie für Dipeptidase hat und weiterhin (l. c. 177), daß sie, abgesehen von dem Sonderenzym Prolinpeptidase, ein einheitliches Enzym darstellt: das Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeiten ihrer wichtigsten Substrate Leucyl-diglycin und -triglycin, Alanyl-triglycin und Glycyl-triglycin bleibt bei verschiedenen Reinigungs-verfahren erhalten.

An sich sollten alle normalen Polypeptide der Amino-polypeptidase zugänglich sein, jedoch gibt es davon einige sehr interessante **Ausnahmen**: es werden Polypeptide, mit einer bestimmten Struktur am Carboxylende erst dann angegriffen, wenn die erste endständige Gruppe durch Carboxy-polypeptidase entfernt ist, so das Penta-peptid Leucyl-triglycyl-tyrosin erst nach Abspaltung des Tyrosins (WALDSCHMIDT-LEITZ **353)**.

Jedoch werden das analog gebaute Tetra- und das Tripeptid, trotz des Tyrosins am Ende, wieder von Amino-polypeptidase (allerdings auch von Carboxy-polypeptidase) gespalten **(353)**. (Wohl wegen der kürzeren Entfernung des Tyrosins vom Aminoende und der dadurch bedingten größeren Basicität der NH_2-Gruppe?). Merkwürdiger Weise wird aber auch Triglycin durch reine Amino-polypeptidase (aus *Aspergillus parasiticus*) nach JOHNSON und PETERSON **354)** nicht gespalten, wohl aber durch den rohen Extrakt, der auch die bisher nicht abgetrennte Carboxy-polypeptidase enthält. — Hierzu sei noch daran erinnert, daß auch Clupein und Clupean gegen Amino-polypeptidase resistent sind (§ 478a).

Zu Punkt 1). Definitionsgemäß greift die Amino-polypeptidase am NH_2 an (BALLS und WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 310) und spaltet die die freie Aminogruppe tragende Aminosäure ab, wie wohl zuerst von GRASSMANN und DYCKERHOFF (l. c. 185) am Leucyl-glycyl-glycin und Glycyl-glycyl-leucin für das Hefeenzym und von ABDERHALDEN (l. c. 359) am l-Leucyl-glycyl-alanin durch Isolirung und Bestimmung der Spaltstücke nachgewiesen wurde. Umgekehrt werden natürlich solche Peptide, in denen die Aminogruppe besetzt ist, durch Amino-polypeptidase nicht gespalten, so z.B. sind unspaltbar Benzoyl-d,l-leucyl-glycin (l. c. 175), Benzoyl-diglycyl-glycin und β-Naphthalinsulfoglycyl-tyrosin (l. c. 185), d,l-N-Methyl-leucyl-diglycin (JOHNSON und PETERSON **354**); weitere Beispiele s. GRASSMANN und MAYR (l. c. 312) und die zusammenfassende Tabelle am Schluß dieses Kapitels.

Dagegen fanden ABDERHALDEN c.s. (l. c. 360) auch Sarcosyl-d,l-leucyl-glycyl-d,l-leucyl-glycin durch „Erepsin" spaltbar; vielleicht aber erfolgte hier die Spaltung auch durch die „Acylase des Erepsin" (s. unten) vom Carboxylende her, worüber nichts ausgesagt werden kann, da die Spaltprodukte nicht festgestellt und auch keine Reinigung der Enzymlösung vorgenommen wurde.

Ein Beweis für die Bedeutung der unmittelbaren Nachbarschaft der NH_2-Gruppe zur Peptid-bindung ist die Unspaltbarkeit des Glutathions durch Amino-polypeptidase (s. o. und § 470, S. 636) und von p-Aminobenzoyl-d,l-leucyl-glycin (l. c. 341).

Spaltung von Dipeptiden mit abgedeckter Carboxylgruppe. Dipeptid-ester, wie Diglycinester und andere, sowie Dipeptid-amide wie Glycyl-d,l-leucin-amid und andere werden nach GRASSMANN **355)**, WALDSCHMIDT-LEITZ und KLEIN (l.c. 144) durch Amino-polypeptidase aus Hefe gespalten. Weitere Beispiele s. GRASSMANN und MAYR (l. c. 312). GRASSMANN **355)**

---

*) Nach den neuen Befunden von BERGMANN (l. c. 296a) über die Differenzirung der Prolinpeptidase von der Amino-polypeptidase, dürfte er wohl auch für die Letztere die unumschränkte Gültigkeit von 3) zugestehen.

352) ***A. K. Balls, F. Köhler,*** Wirkungsw. der Peptidasen. Ber. Chem. Ges., **64,** 294 (1931). — 353) ***E. Waldschmidt-Leitz,*** Strukt. der Prot. auf Grund der enzymat. Anal. Chem. Weekblad, **27,** 266 (1930). S.A. — 354) ***M. J. Johnson, W. H. Peterson,*** Peptidase syst. of Asp. parasiticus. Jl. of Biol. Chem., **112,** 25 (1935). — 355) ***W. Graßmann,*** Unters. über die Spez. proteol. Pflanzenenz. Habil. Schr. München 1928, S. 89.

schreibt auch die Spaltung von Glycyl-d-carboxy-leucin der Amino-polypeptidase zu; vgl. jedoch oben und LINDERSTRØM-LANG (l. c. 343).

Im Gegensatz hierzu fanden WALDSCHMIDT-LEITZ und BALLS (l. c. 175) die Dipeptidester Glycyl-glycin-methyl-ester-Chlorhydrat und Glycyl-d,l-alanin-äthyl-ester-Chlorhydrat, sowie d,l-Leucyl-decarboxy-glycin unspaltbar durch Amino-polypeptidase aus Darmschleimhaut, sodaß entweder ein Specifitätsunterschied von tierischer und Hefe-amino-polypeptidase oder (richtiger) ein besonderes, in der Hefe enthaltenes Enzym für die Spaltung decarboxylirter oder am Carboxyl substituirter Dipeptide (s. auch oben) angenommen wird. Hierzu ist erwähnenswert, daß GRASSMANN **355)** auch eine Spaltung der einfachen Aminosäure-ester und -amide durch dasselbe Amino-polypeptidase-präparat aus Hefe fand. Diese Spaltung, die von BERGMANN und SCHLEICH (l. c. 349) für Glycin-amid bestätigt wird, ist aber (jedenfalls bei dieser Substanz) äußerst gering. — Am Carboxyl substituirte längere Peptide werden natürlich auch durch Amino-polypeptidase aus Darmschleimhaut gespalten (l. c. 175).

Spaltung von Dipeptiden mit weiter entfernter Carboxylgruppe. Glycyl-p-amino-benzoesäure ist spaltbar, Glycyl-o-aminobenzoesäure nicht (BALLS und KÖHLER **356)** mit Darmdipeptidase, s. auch BERGMANN, l. c. 322), während GRASSMANN c.s. (l. c. 302) bei keinem Glycyl-peptid der drei Aminobenzoesäuren eine Spaltbarkeit durch Amino-polypeptidase, sondern nur durch Dipeptidase (s. oben) bei Anwendung von Hefeenzymen finden konnten.

c) Specifität der Carboxy-polypeptidasen.

Auch hier ist noch nicht alles klar, schon deswegen nicht, weil wir erstens nicht wissen, wieviele Carboxy-polypeptidasen es gibt, und zweitens die Grenzen gegen die „Acylasen" nicht sicherstellen können. Klar ist das Verhalten nach 2), 3) und 5). 1) fällt definitionsgemäß weg; im Gegenteil hemmt die benachbarte Aminogruppe: Carboxy-polypeptidase greift deswegen normale Dipeptide nicht an, wohl aber solche mit substituirter oder ganz fehlender Aminogruppe, oder auch mit nur — durch Oxyphenyl — abgeschirmter Aminogruppe. — Punkt 4) ist nicht unbedingt erforderlich: das α'-H braucht nicht vorhanden zu sein, wohl aber das α-H. Damit fällt aber betr. des α'-H auch Punkt 5) fort: die Konfiguration am α'-C ist nach BERGMANN c.s. **357)** für die Wirkung der Carboxy-polypeptidasen belanglos.

Zu Punkt 1) Spaltung von Dipeptiden mit substituirter Aminogruppe. Sarcosyl-l-tyrosin, aber nicht Sarcosyl-d,l-alanin und -d,l-leucin (ABDERHALDEN c.s. **360)**); weitere Beispiele s. bei GRASSMANN und MAYR (l. c. 312) und in der Tabelle am Schluß dieses Kapitels.

Spaltung von Peptiden mit abgeschirmter Aminogruppe. Phenyl-alanyl-arginin (WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 358); weitere Beispiele s. bei GRASSMANN und MAYR (l. c. 312). Außerdem die Tyrosyl-peptide s. unten.

Spaltung von Desamino-peptiden. Glykolyl-glycyl-phenylalanin, Leukolyl-leucyl-glycin, während die entsprechenden Dipeptide Leukolyl-glycin und Glykolyl-phenylalanin nicht spaltbar sind (KAWAI **361)**).

Zu Punkt 2). Die Carboxylgruppe ist definitionsgemäß unerläßlich für die Spaltbarkeit; der Angriff von diesem Ende wurde z. B. von ABDERHALDEN **359)** dadurch bewiesen, daß nach der Einwirkung von „Trypsin" auf Leucyl-glycyl-alanin die Abspaltung von Alanin nachgewiesen werden konnte. Die Substitution der Carboxylgruppe hebt demgemäß die Spaltbarkeit auf: Chloracetyl-l-tyrosyl-benzylamin wird nicht angegriffen (ABDERHALDEN, l. c. 337). Ebensowenig vermag Carboxy-polypeptidase zu wirken, wenn die Carboxylgruppe von der Peptidbindung zu weit entfernt ist, wie die Unspaltbarkeit von z. B. Glycyl- und d,l-Leucyl-d,l-ε-amino-n-heptylsäure (ABDERHALDEN, l. c. 342) zeigt.

Zu Punkt 3). Das Vorhandensein des Peptidwasserstoffs ist für die Wirkung der Carboxy-

356) ***A. K. Balls, F. Köhler,*** Mechanism. der enzymat. Dipeptid-Spalt. Ber. Chem. Ges., 64, 34 (1931). — 357) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich,*** Spez. und Wirkungsw. der sog. Carboxy-polypeptidase. Zs. phys. Chem. 224, 45 (1934). S.A. — 358) ***E. Abderhalden, A. Bahn,*** Dipeptide des l-Tyrosins . . . auf ihre Spaltb. etc. Fermentforsch., 11, 399 (1930). — 359) ***E. Abderhalden, O. Herrmann,*** Z. Problem spezif. Beziehungen etc. (Proteasen). Fermentforsch., 10, 586 (1929). S.A.

polypeptidasen ebenso unerläßlich wie für die Dipeptidase: Chloracetyl-N-methyl-tyrosin wird im Gegensatz zum Chloracetyl-l-tyrosin nach BERGMANN c.s. **357**) nicht gespalten.

Zu Punkt 4). Spaltung von Peptiden mit fehlendem oder substituirtem α'-H: Spaltbar ist Pyruvoyl-d,l-phenyl-alanin (BERGMANN c.s. **357**) l. c. 262), während Pyruvoyl-glycin und -d,l-alanin nicht angegriffen werden. Dies letztere muß allerdings andere Gründe haben und BERGMANN und SCHLEICH (l. c. 262) nehmen an, daß die Unspaltbarkeit der beiden letzteren Verbindungen auf ihrem wesentlich geringeren Säurecharakter beruht.

Zu Punkt 5). Da das α'-H für die Carboxy-polypeptidasen ohne Bedeutung ist, können natürlich auch Peptide mit optischen Antipoden von der Carboxy-polypeptidase gespalten werden, wenn sich diese auf der entsprechenden Seite befinden; so wird nach BERGMANN c.s. **357**) d-Tyrosyl-l-arginin mit gleicher Leichtigkeit wie l-Tyrosyl-l-tyrosin vom Trypsin (d. h. Carboxy-polypeptidase oder Protaminase) gespalten, ebenso l-Alanyl-l-tyrosin, d-Leucyl-l-tyrosin und andere Dipeptide des Tyrosins (ABDERHALDEN und BAHN **358**)). Ist dagegen der Träger der Carboxylgruppe ein optischer Antipode, so wird die Spaltbarkeit aufgehoben: das α-H muß die gleiche räumliche Lage haben wie bei der Dipeptidase s. oben.

Spaltung von acylirten Peptiden. Uebergang zu den Acylasen. Benzoyl-glycyl-glycin (WALDSCHMIDT-LEITZ, l. c. 353 im Gegensatz zu KAWAI **361**)). Sulfonirte Dipeptide (OTANI, l. c. 338), s. Tabelle. Chloracetyl-m-aminobenzoesäure, aber nicht die o- und p-Verbindung (WALDSCHMIDT-LEITZ und BALLS, l. c. 316).

Spaltbar: Chloracetyl-l-prolyl-l-phenylalanin, d,l-α-Brompropionyl-l-prolyl-l-phenylalanin, d,l-α-Bromisocapronyl-l-prolyl-l-alanin (l.c. 179). Benzoylglycyl-l-phenylalanin, -l-leucin und Benzoyl-leucyl-glycin (KAWAI **361**)); durch reines Erepsin nicht, wohl aber durch Roherepsin, also wohl ereptische Acylase, gleichfalls spaltbar.

Die Spaltung dieser Acyl-peptide und besonders der N-acylirten Aminosäuren, wie Chlor-acetyl-l-tyrosin, -l-phenylalanin und anderer wird von ABDERHALDEN c.s. **362**) einem besonderen Enzym im Trypsin-komplex, der **tryptischen Acylase,** zugeschrieben. Dieses ist von der ereptischen Acylase (s. unten) verschieden, da es auf Chloracetyl-alanin nicht einwirkt, wohl aber (wenn auch gering) auf Chloracetyl-l-leucin (l. c. 368). Auch auf Chloracetyl-o-nitranilin wirkt tryptische Acylase nicht ein (l. c. 368), sie bedarf also wohl, ebenso wie die Carboxy-polypeptidase, der freien Carboxylgruppe.

Die Ureide Carbonyl-bis-(glycyl-glycin) und Carbonyl-bis-(glycyl-leucin) werden nach ABDERHALDEN **363**) nicht gespalten. — Zahlreiche weitere Beispiele nach den Untersuchungen von ABDERHALDEN c.s. **362**), **364**) und WALDSCHMIDT-LEITZ (l. c. 144) finden sich bei GRASSMANN und MAYR (l. c. 312).

Spaltung von Tyrosin-dipeptiden. (BERGMANN, l. c. 322). l-Tyrosyl-l-tyrosin und d-Tyrosyl-l-arginin, aber nicht l-Tyrosyl-asparaginsäure (s. auch § 480). Glutaminyl-tyrosin (l. c. 353). l-Prolyl-l-tyrosin (l. c. 337, S. 581).

Verschiedene weitere Beispiele nach den Untersuchungen von ABDERHALDEN c.s. finden sich bei GRASSMANN und MAYR (l. c. 312). Während diese Tyrosin-peptide durch Carboxy-polypeptidase (und zwar nach **365**) durch Tyrosin-carboxy-polypeptidase, s. unten) gespalten werden, sollen Asparagyl-l-dityrosin und andere Peptide der Diaminosäuren nach SUZUKI (l. c. 323) und MIYANOKI **366**) nur durch Tryptase gespalten werden.

Verschiedene Carboxy-polypeptidasen. 1) Protaminase (oder Arginin-carboxy-

---

360) ***E. Abderhalden, E. Schwab, J. G. Valdecasas,*** Verh. von Sarcosin etc. enth. Polypept. geg. n-Alkali etc. Fermentforsch., **13**, 396 (1932). S.A. — 361) ***T. Kawai,*** Wirk. der proteol. Ferm. auf die Benzoyl- und Desaminoderiv. der Polypept. Jl. of Biochem., **10**, 277 (1929). — 362) ***E. Abderhalden c.s.,*** Z. Frage d. Einheitl. des Trypsin-kompl. Fermentforsch., **10**, 474, 478, 481, **12**, 559, 572 (1929/31). S.A. — 363) ***E. Abderhalden, W. Kröner,*** Z. Strukt. der Proteine. Zs. phys. Chem., **168**, 201 (1927). — 364) ***E. Abderhalden c.s.,*** Z. Frage der spezif. Wirk. von Erepsin und Trypsin-kinase. Fermentforsch., **10**, 179, 305, **11**, 78, 143, 539 (1928/30). S.A. — 365) ***E. Abderhalden, E. Schwab,*** Z. Problem der komplexen Natur des Trypsins. Fermentforsch., **12**, 559 (1931). S.A. — 366) ***Y. Miyanoki,*** Konst. der Polypept. und proteol. Ferm. Jl. of Biochem., **13**, 389 (1931). S.A.

polypeptidase) greift an endständigen Carboxylen basischer Aminosäuren an, vorzugsweise am Arginin (WEIL, l. c. 169), aber nach WALDSCHMIDT-LEITZ und CALVERY **367)** anscheinend auch am Lysin und Histidin.

Dementsprechend werden Protamine (Clupein) und besonders das saure Proton des Clupeins gespalten, aber auch Benzyliden-clupein (WEIL, l. c. 169). Wird die Carboxyl-gruppe substituirt, so unterbleibt der Angriff: Clupeinester wird nicht gespalten (WALDSCHMIDT-LEITZ c.s., l. c. 152).

2) Leucin-carboxy-polypeptidase spaltet nach **365)** vor allem solche Polypeptide, in denen Leucin der Träger der Carboxylgruppe ist. Ob ihre Specifität aber wirklich so eng begrenzt ist oder sich nicht doch noch auf andere Peptide erstreckt, ist bisher nicht klar gestellt.

3) Tyrosin-carboxy-polypeptidase spaltet nach **365)** Tyrosin-dipeptide (s. oben) wie Glycyl-l-tyrosin und höhere Tyrosin-peptide wie Leucyl-glycyl-tyrosin, aber keine Acylderivate wie Chloracetyl-l-tyrosin.

Ereptische Acylasen. Während die Spaltung acylirter Peptide durch den Trypsinkomplex seit längerem bekannt ist und Chloracetyl-l-tyrosin sogar meist als charakteristisches Substrat für die Carboxy-polypeptidase (oder wohl richtiger eine Acylase des Carboxy-polypeptidasenkomplexes) benutzt wird, ist dann von ABDERHALDEN und SCHWAB (l. c. 365) auch die Spaltung acylirter Peptide durch „Erepsin" beobachtet und dementsprechend die Existenz einer oder mehrerer Acylasen im Erepsin angenommen worden.

Ob und wieweit diese mit den Acylasen des Trypsins identisch sind, ist fraglich. Chloracetyl-alanin und Chloracetyl-d,l-leucin wurden nach ABDERHALDEN c.s. **369)** (l. c. 365) durch „Erepsin" gespalten, während das charakteristische Substrat der tryptischen Acylase (oder Carboxy-polypeptidase) Chloracetyl-l-tyrosin nicht angegriffen wurde und ebensowenig Chloracetyl-o-nitranilin.

Verschieden hiervon ist nach **368)** die von BALLS und KÖHLER (l. c. 173) in Darmschleimhaut und Leber aufgefundene und von den anderen Enzymen abgetrennte (§ 498) Acylase, die Chloracetyl-o- und -m-nitranilin, Chloracetyl-o-nitro-p-toluidin, Chloracetyl-alanin und Benzoyl-triglycin spaltet. Gering wurden auch Leucyl-diglycin (Amino-polypeptidase!), Acetanilid, Glycyl-o-aminobenzoesäure, aber nicht Chloracetyl-p-nitranilin und Chloracetyl-tyrosin (Unterschied zu Carboxy-polypeptidase!) angegriffen. Nach **368)** wird Chloracetyl-alanin durch diese Acylase nicht gespalten.

Ob und inwieweit sich die **katheptische Carboxy-polypeptidase** in ihrer Specifität von der tryptischen Carboxy-polypeptidase in Bezug auf den Angriff verschiedener Substrate unterscheidet, ist noch keineswegs geklärt. Erwähnenswert ist nur die Beobachtung von ABDERHALDEN **370)**, daß katheptische Carboxy-polypeptidase (aus Leber) Sarcosyl-tyrosin, aber nicht Glycyl-tyrosin (im Gegensatz zur tryptischen Carboxy-polypeptidase) angriff.

d) Papain-polypeptidase.

Über die Specifitätsbedingungen dieser neu aufgefundenen Peptidase ist noch nicht viel bekannt. Von den 5 Punkten scheint sie sicher 3) und 5) in Anspruch zu nehmen (Carbobenzoxy-glycyl-sarcosyl-diglycin, in dem der Peptidwasserstoff durch CH_3 substituirt ist, ist nach **371)** im Gegensatz zum analog gebauten Carbobenzoxy-tetra-

---

367) ***H. O. Calvery,*** Cryst. egg albumin. Jl. of Biol. Chem., **102**, 73 (86) (1933). S.A. — 368) ***E. Abderhalden c.s.,*** Z. Frage der Identität etc. Fermentforsch., **13**, 408 (1932). S.A. — 369) ***E. Abderhalden c.s.,*** Z. Frage der Einheitl. des Erepsins. Fermentforsch., **12**, 223, **14**, 27 (1930/33). S.A. — 370) ***E. Abderhalden, E. Schwab,*** Die aus Leber darstellb. Ferm. etc. Fermentforsch., **13**, 544 (1933). S.A. — 371) ***M. Bergmann, L. Zervas, J. S. Fruton,*** On the specif. of papain. Jl. of Biol. Chem., **111**, 225 (1935). S.A.

glycin unspaltbar, s. u.), wahrscheinlich auch 4), dagegen ist sie von 1) und 2) offensichtlich unabhängig, da sie ihren Anheftungspunkt an zwei benachbarten Amidgruppen hat (vgl. S. 594). Jedoch ist nicht jede Peptid-bindung gleichwertig, die Spaltbarkeit und die Geschwindigkeit des Angriffs scheinen nach BERGMANN c.s. **372)** von der Art der „Seitenkette" abhängig zu sein, s. die Beispiele. Es seien also nur die von BERGMANN c.s. **371)**, **372)** angegebenen Spaltungen hier aufgeführt:

Carbobenzoxyglycyl-glycin
Carbobenzoxyglycyl-diglycin
Carbobenzoxyglycyl-triglycin
Carbobenzoxyglycyl-diglycyl-l-leucyl-glycin
Carbobenzoxy-l-leucyl-glycyl-glycin
Benzoylglycyl-l-leucyl-glycin, aber auch
Benzoylglycyl-**d**-leucyl-glycin (wenn auch langsamer)
Benzoylglycyl-glycyl-l-leucyl-glycin
Benzoyl-d,l-leucyl-glycyl-glycin
Carbobenzoxyglycyl-asparagyl-glycin-äthylester
Carbobenzoxyglycyl-l-isoglutamin
Benzoyl-l-isoglutamin
Carbobenzoxyglycyl-glutamyl-glycin-äthylester
Carbobenzoxyglycyl-l-glutamyl-glycin
Carbobenzoxy-l-glutamyl-glycin-äthylester
Benzoyl-diglycyl-l-glutamyl-glycin-äthylester
α-Benzoyllysin-amid-Hydrochlorid
Dicarbobenzoxylysin-amid-Hydrochlorid
α-Carbobenzoxyglycyl-ε-carbobenzoxylysin-amid
α-Hippuryl-lysyl-glycin-äthylester
α-Hippuryl-ε-carbobenzoxylysin-amid
Hippuryl-amid

Kaum gespalten:
Glycyl-l-glutamyl-glycin-äthylester
Carbobenzoxyglycyl-sarcosyl-diglycin

Unspaltbar:
Glycyl-l-glutamyl-glycin
Glycyl-l-glutaminsäure
Glycyl-l-glutaminsäure-diketopiperazin
ε-Carbobenzoxyglycin-amid-Hydrochlorid
Carbobenzoxy-**d**-leucyl-glycyl-glycin

Anhang: **Atypische Spaltungen.** Wie oben verschiedentlich erwähnt, werden desaminirte Peptide durch die bekannten Peptidasen nicht gespalten. MURACHI **372a)** fand jedoch Glykolylglycin und Glykolyl-diglycin durch Hefepreß-saft spaltbar und Glykolyl-triglycin auch in geringem Masse durch Erepsin. — Ein unbekanntes in allen Präparaten von Hefe und Trypsin und Papain vorkommendes Ferment nehmen GULLAND und MACRAE **372b)** an, das spezifisch auf Oxytocin eingestellt sein soll.

§ 502a. Übersichts-tabelle.

Außer den hier gegebenen Beispielen von theoretischem Interesse ist nun noch neuerdings, d. h. nach der Zusammenfassung von GRASSMANN und MAYR (l. c. 312), die Spaltbarkeit einiger Peptide untersucht worden. Diese Untersuchungen ergaben an sich keine neuen Gesichtspunkte, sondern nur eine Bestätigung der hier dargelegten Grundsätze sowie der Beobachtungen der älteren Autoren. Der Vollständigkeit halber sind in der folgenden Tabelle alle neu-untersuchten Peptide, soweit sie also bei GRASSMANN und MAYR nicht aufgeführt sind, zusammengestellt, auch wenn sie bereits vorher genannt wurden. Eine Ausnahme machen nur die Substrate der Dehydropeptidase und der Papain-polypeptidase; diese sind an den entsprechenden Stellen vollständig aufgeführt; es hat keinen Sinn sie in die Übersichts-tabelle aufzunehmen, da sie ja für sämtliche übrigen Peptidasen unspaltbar sind.

In der Tabelle ist angegeben die Spaltbarkeit resp. Unspaltbarkeit für folgende Fermente: Dipeptidase, Prolylpeptidase, Amino-polypeptidase, tryptische Carboxy-polypeptidase, ereptische Acylase; Sulfopeptidase ist in einer besonderen Tabelle angeführt. Es fehlen demnach die Fermente: Prolinpeptidase, Leucin- und Tyrosin-carboxy-polypeptidase, Protaminase und katheptische Carboxy-polypeptidase, da über deren Wirkungsweise gegenüber weiteren Peptiden keine neueren Untersuchungen vorliegen, bezw. sie in ihrer Spezifität nicht von dem Hauptferment ihrer Wirkungsgruppe abgetrennt wurden (z. B. Substrate der Tyrosincarboxy-polypeptidase finden sich bei Carboxy-polypeptidase); + = spaltbar, — = unspaltbar, 0 = nicht untersucht, ++ = sehr leicht spaltbar, ± = kaum spaltbar oder Spaltbarkeit unsicher.

---

372) ***M. Bergmann, L. Zervas, W. F. Ross,*** Synth. of pept. of l-lysine etc. Jl. of Biol. Chem., **111**, 245 (1935). S.A. — 372a) ***R. Murachi,*** Desaminirte Polypeptide. Acta Scholae med. Kyoto, **9**, 269 (1927); BPh **42**, 36. — 372b) ***I. M. Gulland, Th. F. Macrae,*** Oxytocic hormone etc. Biochem. Jl., **27**, 1237 (1933).

Substrat	Dipeptidase	Prolylpeptidase	Aminopolypeptidase	tryptische Carboxypolypept.	ereptische Acylase
Glycyl-l-alanin	+ [1]	0	0	0	0
Glycyl-aminoisobuttersäure	+ [2]	0	— [1]	0	0
Glycyl-o-aminobenzoesäure	+ [25]	0	— [25] [26]	0	± [3]
Glycyl-m-aminobenzoesäure	+ [25]	0	— [25]	0	0
Glycyl-p-aminobenzoesäure	— [1] + [25]	0	+ [1] [26] — [25]	0	0
Glycyl-l-asparagin	+ [4]	0	— [4]	0	0
Glycyl-l-asparaginsäure	+ [4]	0	— [4]	0	0
Glycyl-l-arginin	+ [5]	0	—	0	0
Glycyl-d-arginin	++ [7] [8]	0	0	0	0
Glycyl-d-glucosaminsäure	— [8] [9]	0	— [8]	— [8]	0
Glycyl-d-epiglucosaminsäure	+ [9]	0	0	0	0
l-Alanyl-glycin	+ [1] [7]	0	— [1]	0	0
d-Alanyl-glycin	+ [1]	0	0	0	0
l-Alanyl-aminoisobuttersäure	+ [1]	0	0	0	0
Aminoisobutyryl-glycin	+ [1]	0	— [1]	0	0
d,l-Leucyl-glycin	0	0	± [10]	0	0
l-Leucyl-l-alanin	+ [1]	0	0	0	0
l-Leucyl-d-alanin	+ [1]	0	— [1]	0	0
l-Leucyl-l-asparagin	+ [4]	0	— [4]	0	0
d-Leucyl-l-asparagin	— [4]	0	— [4]	0	0
d,l-Leucyl-l-asparaginsäure	+ [4]	0	— [4]	0	0
l-Leucyl-l-glutaminsäure	+ [11]	0	— [11]	0	0
l-Pseudoleucyl-l-tyrosin	+ [12]	0	0	— [12]	0
d-Pseudoleucyl-l-tyrosin	— [12]	0	0	— [12]	0
l-Asparaginyl*)-l-tyrosin	+ [13]	0	0	— [13]	0
β-l-Asparaginyl*)-l-tyrosin	— [13]	0	0	0	0
l-Asparagyl*)-α-glycin	+ [11]	0	— [11]	0	0
d,l-Asparagyl*)-β-glycin	— [4] [11] [14]	0	— [4] [11] [14]	0	0
l-Asparagyl*)-diglycin	+ [11]	0	— [11]	0	0
d,l-Asparagyl*)-l-dialanin	+ [11]	0	— [11]	0	0
l-Glutaminyl*)-l-glutaminsäure	+ [6]	0	0	0	0
l-Glutaminyl*)-l-tyrosin	+ [13]	0	— [13]	— [13]	0
l-Glutamyl*)-α-glycin	+ [11]	0	— [11]	0	0
l-Glutamyl*)-l-glutaminsäure	+ + [7]	0	0	0	0
l-Glutamyl*)-l-tyrosin	+ + [7]	0	0	0	0
l-Prolyl-glycin	— [15]	+ [15]	+ [15]	— [15]	0
l-Prolyl-l-alanin	— [15]	+ [15]	+ [15]	— [15]	0
l-Prolyl-l-serin	— [15]	+ [15]	+ [15]	— [15]	0
l-Prolyl-l-phenylalanin	0	+ [15]	0	± [15]?	0
l-Prolyl-l-tyrosin	0	+ [15]	0	+ [15]	0
d-Phenylalanyl-d-arginin	— [8]	0	0	0	0
l-Phenylalanyl-d-glucosaminsäure	— [8] [9]	0	— [8]	— [8]	0
l-Tyrosyl-l-asparaginsäure	++ [6] [7]	0	— [13]	— [13]	0
d-Tyrosyl-l-arginin	0	0	0	+ [16]	0
l-Tyrosyl-l-tyrosin	+ [6] ++ [7]	0	— [6] [13]	+ [6] [13]	0
l-Lysyl-glycin	+ [6] + [7] [17]	0	— [17]	— [17]	0
l-Lysyl-asparaginsäure	+ [7]	0	0	0	0
l-Lysyl-l-asparaginsäre	+ [6] [17]	0	— [17]	— [17]	0
l-Lysyl-l-glutaminsäure	+ [6] [7] [8] [28]	0	— [8]	— [8]	0
l-Lysyl-l-histidin	++ [6] [7] [8] [17]	0	— [8] [17]	— [8] [17]	0
d-Lysyl-glycin	+ [8]	0	— [8]	— [8]	0
d-Lysyl-l-asparaginsäure	+ [8]	0	— [8]	— [8]	0
Sarcosyl-l-tyrosin	— [1]	0	— [1]	+ [2]	0
Triglycin	0	0	— [10]	0	0
Glycyl-d,l-leucyl-glycin	0	0	+ [10]	0	0
Diglycyl-phenylalanin	0	0	0	0	+ [18]

*) Asparagyl = Rest der Asparaginsäure, ebenso Glutamyl, während Asparaginyl = Rest des Asparagins ist, ebenso Glutaminyl.

Substrat	Dipeptidase	Prolylpeptidase	Aminopolypeptidase	tryptische Carboxypolypept.	ereptische Acylase
Glycyl-glycyl-l-asparagin	— [4]	0	+ [4]	0	0
Glycyl-l-prolyl-l-phenylalanin	0	+ [15]	+ [15]	± [15]	0
l-Alanyl-glycyl-d,l-leucin	— [19]	0	+ [19]	— [19]	0
d,l-Alanyl-l-prolyl-l-phenylalanin	0	+ [15]	+ [15]	— [15]	0
Leucyl-diglycin	0	0	+ [3] [10]	0	0
Dileucyl-glycin	0	0	0	0	+ [18]
d,l-Leucyl-l-prolyl-glycin	— [15]	+ [15]	+ [15]	— [15]	0
d,l-Leucyl-l-prolyl-l-alanin	— [15]	+ [15]	+ [15]	— [15]	0
l-Leucyl-l-prolyl-l-tyrosin	0	+ [15]	+ [15]	+ [15]	0
Glutamyl-cysteinyl-glycin (Glutathion)	— [20]	0	— [20]	+ [20]	0
Benzoyl-glycyl-glycin	— [18]	0	— [10] [18]	— [18]	— [18]
Benzoyl-diglycyl-glycin	0	0	0	0	+ [3] — [18]
Benzoyl-glycyl-l-leucin	— [18]	0	— [18]	+ [18]	+ [18]
Benzoyl-glycyl-l-phenylalanin	— [18]	0	— [18]	+ [18]	+ [18]
Benzoyl-leucyl-glycin	— [18]	0	— [18]	+ [18]	+ [18]
d-(ε-Benzoyllysyl)-d-glutaminsäure	+ [8]	0	— [8]	— [8]	0
l-(ε-Benzoyllysyl)-l-glutaminsäure	+ [17]	0	— [17]	— [17]	0
N-Methyl-d,l-leucyl-glycin	— [1]	0	— [1]	0	0
d,l-N-Methylleucyl-diglycin	0	0	— [10]	0	0
Chloracetyl-l-prolyl-l-phenylalanin	0	— [15]	— [15]	+ [15]	0
d,l-α-Bromproprionyl-l-prolyl-l-phenylalanin	0	— [15]	— [15]	+ [15]	0
d,l-α-Bromisocapronyl-l-prolyl-l-alanin	0	— [15]	— [15]	+ [15]	0
Carbobenzoxyglutaminyl-l-tyrosin	— [13]	0	0	+ [13]	0
Carbobenzoxy-l-tyrosyl-l-tyrosin	— [13]	0	0	+ [13]	0
Phenylisocyanat-glutathion	— [20]	0	— [20]	+ [20]	0
d,l-α-Bromisocapronyl-glutathion	— [20]	0	— [20]	+ [20]	0
Phenylisocyanat-cysteinyl-glycin	— [20]	0	— [20]	+ [20]	0
Glycyl-p-nitranilin	— [1]	0	+ [2]	0	0
Chloracetyl-alanin	0	0	0	0	+ [3]
Benzoyl-l-leucin	— [22]	0	— [22]	— [22]	+ [22]
Benzoyl-d,l-phenylalanin	— [22]	0	— [22]	— [22]	+ [22]
Monobenzoyl-d,l-tyrosin	— [22]	0	— [22]	— [22]	+ [22]
Chloracetyl-tyrosin	0	0	0	+ [3]	— [3]
Chloracetyl-N-methyl-l-tyrosin	0	0	0	— [16]	0
Chloracetyl-o-nitranilin	0	0	0	0	+ [3]
Chloracetyl-m-nitranilin	0	0	0	0	+ [3]
Chloracetyl-p-nitranilin	0	0	0	0	— [3]
Chloracetyl-o-nitro-p-toluidin	0	0	0	0	+ [3]
Pyruvoyl-glycin	0	0	0	— [23]	0
Pyruvoyl-d,l-alanin	0	0	0	— [23]	0
Pyruvoyl-d,l-phenylalanin	0	0	0	+ [16] [23]	0
d,l-Leucyl-methylamin	0	0	± [10]	0	0
Acetanilid	0	0	0	0	± [3]
d-Epi-glucosaminsäure	+ [8]	0	0	0	0
Glykolyl-phenylalanin	— [18]	0	— [18]	— [18]	0
Glykolyl-glycyl-phenylalanin	— [18]	0	— [18]	+ [18]	0
Glykolyl-glycin	— [27]	0	— [27]	0	0
Glykolyl-diglycin	— [27]	0	— [27]	0	0
Glykolyl-triglycin	— [27]	0	± [27]	0	0
Leukolyl-glycin	— [18]	0	— [18]	— [18]	0
Leukolyl-leucyl-glycin	— [18]	0	— [18]	+ [18]	0
Glycyl-d,l-α-aminotricarballylsäure	+ [28]	0	+ [28]?	— [28]	0

Abgeschlossen: 5. 8. 36. Ber. Phys. 94, H. 3/4.

Substrat	Dipeptidase	Amino-polypeptidase	tryptische Carboxy-polypeptid.	Sulfopeptidase
Benzolsulfoglycyl-glycin	— 21)	— 21)	— 21)	+ 21)
p-Toluolsulfoglycyl-glycin	— 21)	— 21)	— 21)	+ 21)
β-Naphtalinsulfoglycyl-glycin	— 21)	— 21)	— 21)	+ 21)
β-Naphtalinsulfoglycyl-l-leucin	— 21)	0	+ 21)	+ 21)
β-Naphtalinsulfoglycyl-d,l-leucin	— 21)	0	+ 21)	+ 21)
β-Naphtalinsulfoglycyl-d,l-phenylalanin	— 21)	0	+ 21)	+ 21)
β-Naphtalinsulfo-d,l-leucyl-glycin	— 21)	— 21)	— 21)	— 21)
β-Naphtalinsulfo-d,l-leucyl-l-leucin	— 21)	— 21)	— 21)	— 21)
β-Naphtalinsulfo-d,l-leucyl-d,l-leucin	— 21)	— 21)	— 21)	— 21)
β-Naphtalinsulfo-d,l-leucyl-d,l-phenylalanin	— 21)	— 21)	— 21)	— 21)
β-Naphtalinsulfoglycin	0	0	0	— 24)

Literatur zur Tabelle: 1) BERGMANN c.s. (l. c. 333). — 2) ABDERHALDEN c.s. (l. c. 360). — 3) BALLS und KÖHLER (l. c. 173). — 4) GRASSMANN und BAYERLE (l. c. 329). — 5) BERGMANN c.s. **373**). — 6) BERGMANN und ZERVAS (l. c. 325). — 7) BERGMANN (l. c. 322). — 8) RINKE (l. c. 327). — 9) BERGMANN **374**). — 10) JOHNSON und PETERSON (l. c. 354). — 11) GRASSMANN und SCHNEIDER (l. c. 331). — 12) ABDERHALDEN und FAUST **375**). — 13) BERGMANN **376**). — 14) LEVENE c.s. (l. c. 309). — 15) ABDERHALDEN und MERKEL (l. c. 179). — 16) BERGMANN c.s. (l. c. 357). — 17) BERGMANN c.s. (l. c. 326). — 18) KAWAI (l. c. 361). — 19) ABDERHALDEN und NEUMANN **377**). — 20) ABDERHALDEN und GEIDEL **378**). — 21) OTANI (l. c. 338). — 22) KAWAI **379**). — 23) BERGMANN und SCHLEICH (l. c. 262). — 24) H. OTANI (l. c. 265). — 25) GRASSMANN (l. c. 302). — 26) BALLS und KÖHLER (l. c. 356). — 27) MURACHI (l. c. 372a). — 28) GREENSTEIN (l. c. 324a).

VI. Vorkommen und Bedeutung.

§ 503. Vorbemerkung. Wie aus den Darlegungen des „Allgemeinen Teils", §§ 454 ff. hervorgeht, ist heute die Gruppe der Peptidasen klar und deutlich gegen die Proteinasen, d. h. also gegen die eigentliche Eiweiß-spaltung abgegrenzt. Damit ist aber auch ihre biologische Stellung scharf umrissen. Die noch vorhandenen Unklarheiten und Lücken in unseren Kenntnissen über die einzelnen Peptidasen spielen dafür nur eine sehr geringe Rolle. Die biologische Wirkung der Peptidasen als Gesamtheit ist nunmehr streng eingefaßt in den Rahmen des Abbaus der Proteine schlechthin, sei es zum Zwecke der Verdauung im Darmkanal, sei es im Zellstoffwechsel. Alle die früheren Wirrnisse, die einen wesentlichen Teil unserer Erörterungen im H.W. ausmachen mußten, sind aufgehellt; es ist eben ganz selbstverständlich geworden, daß überall da, wo biologisch Eiweiß abgebaut wird, als Vollender des Weges neben den Proteinasen auch Peptidasen mitwirken, und man kann sogar mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß biologisch gemessen die Wirkung beider Gruppen stets annähernd gleich stark sein wird. So ist es nicht zu verwundern, daß die Arbeiten, die sich mit dem Aufsuchen und der Wirkung der Peptidasen beschäftigen, nicht mehr sehr zahlreich sind, und daß Arbeiten mit großen Problemstellungen ziemlich ganz fehlen. Die hier ins Gewicht fallenden Fragen werden

373) ***M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke***, Synth. von Peptiden des Arginins. Zs. phys. Chem., 224, 40 (1934). S.A. — 374) ***M. Bergmann c.s.***, Dipeptide von ... Glucosaminsäuren etc. Zs. phys. Chem., 224, 33 (1934). S.A. — 375) ***E. Abderhalden, W. Faust***, Verh. von Polypept. etc. Fermentforsch. **14**, 407 (1935). S.A. — 376) ***M. Bergmann c.s.***, Dipeptide mit ... sauren Eigensch. etc. Zs. phys. Chem., **224**, 17 (1934). S.A. — 377) ***E. Abderhalden, A. Neumann***, Polypeptide, die ... abwechselnd Glykokoll und l (+)-Alanin enth. etc. Fermentforsch., **14**, 133 (1934). S.A. — 378) ***E. Abderhalden, W. Geidel***, Strukt. des Glutathions etc. Fermentforsch., **13**, 97 (1931). — 379) ***T. Kawai***, Ferm. Spalt. der Benzoylaminosäuren. Acta Scholae med. Kyoto, **11**, 121 (1928); BPh **50**, 440.

meist im Rahmen der „Autolyse" studirt, die den Eiweißabbau in der Zelle als Gesamterscheinung behandelt, und auf die wir erst im Hauptteil XV zurückkommen werden. Hier seien also ohne viel Theorie die relativ spärlichen Daten zusammengestellt.

A. Peptidasen in Sekreten.

1) Ereptasen in Pankreas und Darm.

§ 504. Über das früher so eingehend behandelte Problem liegt außer den im Vorangegangenen wiedergegebenen Arbeiten über die Enzyme selbst, ihre Trennung und Charakterisirung, so gut wie nichts Neues vor. Die erste Periode der allgemeinen Aufklärung der Verhältnisse ist abgeschlossen, und eine systematische Untersuchung der Peptidasen des Verdauungsapparates in ihrer Beziehung zu physiologischen und pathologischen Vorgängen hat noch nicht begonnen. Wie auch früher schon, wird hier hauptsächlich der Eiweißabbau als Ganzes untersucht; dabei muß aber beachtet werden — worauf wir schon im H.W. mehrfach hingewiesen haben —, daß sehr häufig die eigentliche Proteolyse untersucht werden sollte, während man nach der Methodik (Peptidspaltung) tatsächlich eben die Peptidasen untersucht hat. Eine systematische Durchprüfung des Verhaltens der Peptidasen im Verdauungsapparat bei verschiedenen Bedingungen ist eine noch kaum in Angriff genommene Aufgabe.

Die entscheidend wichtigen physiologischen Folgerungen, die man aus den im Vorangegangenen geschilderten enzymtypischen Untersuchungen zu ziehen hat, liegen in der völlig neuen Einstellung zur Funktion der Verdauungs-drüsen, des Pankreas und des Darms. Die alte Auffassung eines besonderen „Trypsins" neben dem „Erepsin" der Darmschleimhaut rechnete bei der angenommenen Verschiedenheit dieser beiden Fermente auch mit einer verschiedenen physiologischen Funktion. Man dachte sich das etwa so, daß an den Peptonen der Magenverdauung zuerst das Trypsin ansetzt und dann das Erepsin sozusagen eine Nachlese hält, um die gesamten Aminosäuren freizusetzen. Dies wurde auch dadurch nicht wesentlich erschüttert, als man — wie dies ja schon im H.W. erörtert werden konnte — an der Einheitlichkeit des Trypsins mit guten Gründen zu zweifeln begann, und in ihm ein Gemisch einer Tryptase mit einer ereptischen Komponente erblickte; denn man glaubte Verschiedenheiten in der Wirkung zwischen diesem erepsinähnlichen Enzym und dem echten Erepsin des Darmes gefunden zu haben. Die gelungene präparative Trennung des Trypsins in eine „Tryptase" und eine „Ereptase", die sich in keiner Weise von dem „echten" Erepsin unterschied (WALDSCHMIDT-LEITZ **1—3**)), hat alle diese Erwägungen wesenlos gemacht. Die chemischen Unterschiede in der Specifität auf gewisse Polypeptide zwischen den Erepsinen des Pankreas und des Darmes existiren nicht. Dipeptidase und Polypeptidase haben in beiden Fällen die gleiche Wirkung und sind somit, und ebenso nach ihrem äußeren Verhalten, identisch, wie zuerst WALDSCHMIDT-LEITZ **3**) an wirkungsrein dargestellten Präparaten gezeigt hat. Diese Dinge sind ja im Vorangegangenen eingehend besprochen; hier sind sie nur deshalb nochmals zu erwähnen, weil eben dadurch die im H.W. S. 873 diskutirten Unterschiede in der physiologischen Bedeutung, betr. eine besondere Rolle des

---

1) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck,*** Trypt. und erept. Wirk. der Pankreasdrüse. Zs. phys. Chem., **147**, 286 (1925). — 2) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck,*** Spec. Wirk. von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin. Zs. phys. Chem., **149**, 203 (1925). — 3) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner,*** Darmerepsin. Zs. phys. Chem., **151**, 31 (1925).

Darmerepsins bei der Verdauung, als wesenlos erkannt sind. Die Verdauung durch den Darmsaft bringt demnach kein neues Moment zu der Spaltung durch den in den Darm ergossenen Pankreas-saft hinzu, und so tritt die schon früher diskutirte Frage (H.W. S. 873) wieder hervor, ob das secernirte Darmerepsin überhaupt ein autochthones Ferment der Darmzellen ist oder ob es nicht überhaupt aus dem Pankreas stammt, wie in Analogie zu älteren Untersuchungen WALDSCHMIDT-LEITZ 4) eine Zeitlang für wahrscheinlich hielt. Selbstverständlich produciren die Darmzellen ihre Peptidasen wie jede andere Organzelle auch; und es steht nur zur Diskussion, ob sie das Enzymgemisch auch für die Sekretion, also für die Verdauung im Darmlumen, erzeugen. Für die Dipeptidase scheint dies nach Fistelversuchen von WALDSCHMIDT-LEITZ 5) jedenfalls zu gelten, da diese sich auch nach monatelanger Abtrennung vom Pankreas noch im Fistelsekret vorfand; für die Polypeptidasen scheint es noch nicht genügend untersucht. Das Hauptergebnis ist, daß die Darmzellen genau dasselbe Enzymsystem besitzen, wie das Pankreas, das auch wie beschrieben in derselben Weise in seine Bestandteile aufgelöst werden kann. Es enthält also — neben wenig Tryptase (die aber wohl aus dem Pankreas stammt, da sie im Fistelsekret fehlt) (5). — Dipeptidase und Amino-polypeptidase (6), sowie auch Carboxy-polypeptidase (IMAI 7), KAWAI 8), UTZINO 9)). Daneben besteht nach WILLSTÄTTER 10) noch die Möglichkeit, daß ein erheblicher Teil des Erepsins im Darmsekret aus Leukocyten stammt, wie er dies ja sogar für die Tryptase des Pankreas diskutirt. Nach LINDERSTRØM-LANG wird es von den Zylinderzellen und den BRUNNER-Zellen erzeugt (s. u.).

Pankreassekret. Die Frage, ob der freiwillig secernirte Pankreas-saft — aus Fisteln — ein wahres Abbild der Produktionsverhältnisse der Drüse an sich ist, ist auch heute noch nicht klar. Die widersprechenden Ergebnisse sind wahrscheinlich am einfachsten so zu deuten, daß die Befunde in jedem Fall — genügend exakte Methodik vorausgesetzt — wirklich reell sind; mit anderen Worten, daß sich das Sekret verschieden verhalten kann, je nachdem es völlig „normal" ist oder gewisse abnorme Reizzustände vorliegen, die etwa mit einem beschränkten Zellzerfall einhergehen, der Fermente in das Sekret abgibt, die im völlig „normalen" Sekret fehlen. Dies scheint in gewissem Umfange bei der Sekretion der Fall zu sein, wenn man sie durch parasympathische Gifte (Pilocarpin) provozirt; Näheres bei Tryptase, § 539. Dasselbe wird ungefähr vom Darmsekret gelten, besonders dann, wenn wirklich im Sinne WILLSTÄTTER's ein erheblicher Teil der Enzyme aus zerfallenen Leukocyten stammt.

WALDSCHMIDT-LEITZ 5) fand im Sekret von Pankreas und Darm keine qualitativen Unterschiede. Wohl aber sind die Enzyme — Tryptase und die damals noch nicht aufgeteilten Peptidasen — in 5—10mal geringerer Konzentration in den Spontansäften enthalten; außerdem ist gerade beim Erepsin der Reinheitsgrad ein erheblich ungünstigerer als beim Drüsenextrakt. Beim Pankreas-saft ließ sich nicht völlig ausschließen, daß ihm Darmsekret beigemengt war.

---

4) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck***, Spontane Aktiv. des Trypsins. Zs. phys. Chem., **149**, 221 (1925). — 5) ***E. Waldschmidt-Leitz, J. Waldschmidt-Graser***, Enzym. Wirk. von Pankreas- und Darmsekret. Zs. phys. Chem., **166**, 247 (1927). S.A. — 6) ***E. Waldschmidt-Leitz c.s.***, Dipeptidase etc. aus Darmschleimhaut. Ber. Chem. Ges., **62**, 956 (1929). — 7) ***T. Imai***, Wirk. des Erepsins auf benzoyl. Polyp. Zs. phys. Chem., **136**, 205 (1924). — 8) ***T. Kawai***, Wirk. der proteol. Ferm. auf . . . Benzoylderiv. der Polyp. Jl. of Biochem., **10**, 277 (1929). — 9) ***S. Utzino***, Wirk. der proteol. Ferm. auf Phthalyl-etc. Deriv. der Polyp. Jl. of Biochem., **9**, 453 (1928). — 10) ***R. Willstätter, E. Bamann***, Proteasen der Magenschleimhaut. Zs. phys. Chem., **180**, 127 (1928). S.A.

Demgegenüber fanden LEBRETON c.s. 11) in mit Katheter gesammeltem Pankreassekret — neben inaktiver Tryptase — nur Protaminase und Carboxy-polypeptidase, dagegen keine Amino-polypeptidase und keine Dipeptidase. Ebenso verhielt sich Secretin-saft; dagegen enthielt Saft nach WITTE-Pepton und Pilocarpin geringe Mengen Dipeptidase. Diese Peptidasen (ebenso wie Kinase) sollen also nur im Sekret leicht geschädigter Pankreas-drüsen auftreten, in der normalen Sekretion fehlen.

Pylorussekret enthält, wenn zellfrei, keinerlei Proteasen (TAKATA 12), KESTNER c.s. 13)), auch keine Peptidasen; Cardiasekret noch nicht exakt untersucht. Der eigentliche Magensaft (des Fundus) enthält wegen der stark sauren Reaktion keine Peptidasen, wie längst bekannt. Die Zellen des Magens enthalten Peptidasen (§ 509).

Reines **Darmsekret** (aus isolirten Schlingen durch Spülung) enthält auch nach Monaten noch Peptidasen, die also ein autochthones Produkt des Darmepithels sind (WALDSCHMIDT-LEITZ 5)).

Faeces. Verminderung der Peptidasewerte bei Brustkindern BUDDE 14) (Säurewirkung durch Gärungsacidität). Nach PFEIFFER (l. c. 32) ist die Dipeptidase für Glycyltryptophan im Kot sehr ungleich enthalten: Mensch, Hund, Maus, Ratte reichlich, Kaninchen sehr spärlich, *Cavia* Null.

Fetus. Im fetalen Darm Peptidase vom 3. Monat an steigend mit der Entwicklung, ebenso im Meconium (ABE 16)).

2) Peptidasen in anderen Sekreten; Harn.

§ 505. **Milch** enthält nach HEIDUSCHKA 17) keine Peptidase, nur bei inficirter Milch nachweisbar. Dagegen soll menschliches Colostrum Peptidase enthalten (18).

Speichel. Die Hauptmenge der Peptidase ist an geformte Elemente gebunden, jedoch enthält auch der zellfreie Speichel geringe Mengen (WILLSTÄTTER c.s. 19)). Die sterile **Galle** ist nach STURM (l. c. 34) frei von Peptidase.

Im **Harn** sind Peptidasen meist im Zusammenhang mit Untersuchungen des Blutserums aufgefunden worden. So fand BÖHMIG 20) sie vermehrt bei Parenchymschädigungen der Leber, sowie bei fieberhafter Tuberculose der Lunge; stark gesenkt bei Anaemia perniciosa. Fast stets wird angegeben, daß im Blut vermehrte Peptidase auch in den Harn übergeht oder aber auffallend retinirt wird, s. also § 506. Dipeptidase und Polypeptidasen im Harn methodisch und quantitativ ABDERHALDEN und BUADZE 21). Normaler Harn schwankende Werte, häufig = Null (PFEIFFER 22)); findet sich schon im ersten Harn des Neugeborenen, nimmt dann schnell zu, gegen Ende des 1. Jahres ab. Hohe Werte zwischen 20—30 Jahren beim Mann, geringere bei der Frau, von 30 Jahren wenig oder Null. Dieses normale Ferment stammt aus dem Enddarm. Wo dort das Enzym fehlt (Maus, *Cavia*), fehlt es auch im Harn. **Fruchtwasser** ABE 16).

---

11) ***E. Lebreton, F. Mocoroa (E. Stulz)***, Ferm. protéol. du suc pancr. (intest.). C. R., **192**, 1492, **193**, 79 (1931). — 12) ***M. Takata***, On the pyloric juice. Jl. of Biochem., **2**, 33 (38) (1923). — 13) ***O. Kestner, R. Willstätter, E. Bamann***, Proteasengeh. des Pylorussekrets. Zs. phys. Chem., **180**, 187 (1929). — 14) ***O. Budde***, Tryptase und Peptidase im Säuglingsstuhl. Zs. Kindhlk., **46**, 202 (1928). S.A. — 15) ***T. Tachibana***, Phys. invest. of fetus. Jap. Jl. Obst., **10**, 40 (1927); BPh **46**, 232. — 16) ***M. Abe***, Erepsin in liquor amnii and fetal intest. etc. Jap. Jl. Obst., **16**, 225 (1933); BPh **77**, 317. — 17) ***A. Heiduschka, E. Komm***, Peptidasen in der Milch. Zs. phys. Chem., **196**, 187 (1931). — 18) ***Y. Katsu***, Ferm. in the human colostrum. Jap. Jl. Obst., **14**, 268 (1931); BPh **67**, 165. — 19) ***R. Willstätter, E. Bamann, M. Rohdewald***, Enz. der Speicheldrüse. Zs. phys. Chem., **186**, 85 (1929). — 20) ***L. Böhmig***, Peptidasenbest. am kranken Menschen. Wien. Arch. inn. Med., **14**, 129, 463 (1927), **19**, 89 (1929). — 21) ***E. Abderhalden, S. Buadze***, Nachw. von Polypeptidasen im Harn. Fermentforsch., **13**, 363 (1932), **14**, 143 (1934). — 22) ***H. Pfeiffer, F. Standenath***, Peptidasenhaushalt des Menschen etc. Fermentforsch., **8**, 327 (1925).

B. Peptidasen der Zellen und Gewebe*).

1) Blutserum.

§ 506 (*H.W.* § *511*). Die Frage, ob „normales" Serum Peptidasen enthält, ist sehr lange umstritten gewesen. ABDERHALDEN (*l. c. 507*) fand keine Peptidasen; demgegenüber standen einige ältere und neuere Angaben. Die Schwierigkeit der Frage ist einerseits eine methodische, andererseits die Aussage, was „normales" Serum ist; denn daß bei allerlei Arten von Zellzerfall Peptidasen auftreten, ist niemals bestritten worden.

Da nun zweifellos wie alle Blutfermente auch diese irgendwelchen Zellen entstammen müssen, so ist diese Frage mit voller Exaktheit überhaupt nicht zu beantworten. Immerhin kann man sie konventionell darauf beschränken, daß man aussagt: „normales" Serum ist solches von gesunden Tieren, in das keine erst bei dem mit der Gerinnung einhergehenden Zellzerfall freigesetzte Fermente hineingelangt sind. In diesem Sinne haben sich im Gegensatz zu ABDERHALDEN schon früher einige Autoren für ein Vorkommen von Peptidase im normalen Serum ausgesprochen, denen sich neuerdings weitere angeschlossen haben (**23—25**), sowie vor allem PFEIFFER, auf dessen Arbeiten wir im Zusammenhang zurückkommen. Bei der Beurteilung müssen alle Versuche ausgeschaltet werden, die eine „Peptonspaltung" als Methode angewendet haben; denn entgegen der früheren Annahme greifen ja Peptidasen die meisten „Peptone" nicht an.

Die Frage ist dann mit moderner Methodik von GRASSMANN **26**) endgültig dahin beantwortet worden, daß jedes Serum aller Tiere Dipeptidase und reichlich Amino-polypeptidase enthält, die anderen waren nicht sicher nachzuweisen.

Die Dipeptidase verschwindet schnell, bei allen ist der Gehalt stark wechselnd; Schwein > Schaf, Kaninchen > Rind > Mensch, Pferd. Die Enzyme stammen wahrscheinlich aus den Blutkörpern, treten aber nicht erst bei der Gerinnung infolge Zellzerfalls auf. Wohl aber scheint eine Vermehrung bei Zellzerfall in den Geweben einzutreten.

Differenzirung der Wirkungen gegenüber verschiedenen Polypeptiden HANSON **27**); z. B. wird Chloracetyl-tyrosin nicht gespalten, wohl aber Chloracetyl-alanin. Vermehrung nach Injektion von Polypeptiden, aber nicht specifisch. Bei Hühnern nach MASCHMANN (l. c. 59) spärlich oder fehlend. R. ABDERHALDEN **28**) fand im normalen Blut Amino-polypeptidase; nach Injektion von an der Aminogruppe substituirten Polypeptiden traten als „Abwehrfermente" auch diese spaltende Peptidasen, also Carboxy-polypeptidasen auf.

GRASSMANN fand starke Erhöhung bei fieberhaften Erkrankungen, sowie im Puerperium. Weiter Erhöhung bei Fieber und Ernährungsstörungen, sowie Strahlenwirkung (Sonne, RÖNTGEN-

---

*) Es muß ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß es an dieser Stelle nicht möglich und auch nicht notwendig ist, alle casuistischen Arbeiten über das Vorkommen von Peptidasen anzuführen. Es sind sehr häufig in Arbeiten, die sich hauptsächlich mit den Proteinasen beschäftigen, nebenher auch Angaben über Peptidasen enthalten, die auszusondern sich nicht verlohnt. Es sei also zur Vervollständigung ein für alle Mal auf die diesbezüglichen Angaben im XV. Hauptteil verwiesen.

23) ***A. Mertz, H. Meyer,*** Peptidase-Unt. im Säuglingsalter etc. Jb. Kind., **112**, 149 (1926); BPh **87**, 416. — 24) ***Isou Ma,*** Unt. über den Eiweißzerfall im Fieber m. der Peptidasereaktion. M.-S. Kind., **36**, 363 (1927). — 25) ***R. Schäfer,*** Bedeut. der Polypeptidasen für die Diagnose von malignen Tumoren. D. Arch. klin. Med., **161**, 313 (1928). — 26) ***W. Graßmann, W. Heyde,*** Peptidasen des Blutserums. Zs. phys. Chem., **188**, 69 (1930). — 27) ***H. Hanson,*** Einfl. parenter. Zufuhr von Polyp. auf den Geh. des Blutplasma an Polypeptidasen. Fermentforsch., **14**, 189 (1934). — 28) ***R. Abderhalden,*** Abwehrferm. aus der Gruppe der Polypept. Fermentforsch. **14**, 370 (1934).

Strahlen) (MERTZ 28)), Schwangerschaft, Pneumonie (HANSON 27)). Bei Pankreasnecrose geringe Erhöhung, auch im Harn, wahrscheinlich Abfangung durch die Leber (BOSHAMER 29)); bei Tumoren nur vereinzelt (HANSON); (im Gegensatz dazu die PFEIFFER'sche Peptidase verstärkt, SCHÄFER 25)). Starke Abnahme bei Anaemia perniciosa BÖHMIG 20). Bei Leberschädigungen während der akuten Krankheit Retention, bei Heilung Ausschwemmung in den Harn (BÖHMIG 20)). Nach Nierenexstirpation und bei Urannephritis Zunahme (MURATA, l. c. 49).

Besonders eingehend haben PFEIFFER c.s. (*l. c. 516*), **30—32)** den Peptidasenhaushalt unter normalen und pathologischen Bedingungen untersucht, mit Hilfe von Glycyl-tryptophan als Reagens, worüber PFEIFFER selbst im H.W., Bd. III, S. 1561 berichtet hat. Er fand nach seinem „Index" im normalen Serum des Menschen fast stets unverändert 50 Einheiten (Harn stark schwankend). Bei Tieren sehr verschieden, am höchsten bei Nagern. Starke Steigerung deutet überall auf Eiweißzerfalls-toxicosen.

Epilepsie ist vor dem Anfall durch Steigen im Blut, Verschwinden im Harn begleitet; nach dem Anfall Absinken im Blut bis auf normale Werte, Ausschwemmung im Harn. Das Ferment scheint aus dem Enddarm zu stammen. Bei Impfmalaria sehr starke Steigerungen im Blut, Verschwinden im Harn; ähnlich bei Erysipel. Bei diesen Fiebern stammt das Ferment nicht aus dem Darm, vielmehr aus zerfallenem Gewebe. Nur mit Gewebszerfall einhergehende Fieber steigern, nicht bloße Reizung des Wärmezentrums (Wärmestich, Typhusvaccine, Tetrahydro-naphtylamin; Staphylokokken-infektion nur bei Gewebseinschmelzung). Bestätigung für Fieber, Impfung, ultraviolette Strahlen MA 24); KRAFT **33)** fand mit der PFEIFFER'schen Methodik Steigerungen bei eitrigen Prozessen mit Gewebseinschmelzung, besonders Perforationsperitonitis, Gelenkeiterungen, Gallenerkrankungen. Letzteres bestätigt von STURM **34)**, auch bei Unterbindung der Arteria hepatica (Kaninchen, nicht Hund, bei dem dieser Eingriff kaum wesentliche Schädigung bewirkt). Bei Tumoren fand SCHÄFER 25) in 37 Fällen 23mal starke Steigerung.

Ein Antiferment gegen diese Peptidase wird nicht gebildet **(35)**.

2) Lymphen, Transsudate.

§ 507 (*H.W. § 513*). Im Waschwasser von gesundem Peritoneum (*Cavia*) fand PFEIFFER die Glycyl-tryptophan spaltende Peptidase. **Liquor cerebrospinalis** enthält in der Norm keinerlei Proteasen (PFEIFFER, HEYDE **36**)). Bei Meningitis tuberculosa tritt Peptidase nach LENK (*l. c. 518*) und BÖHMIG (l. c. 20) auf. Bei Epilepsie nach PFEIFFER keine sicheren Beziehungen. Bei Geisteskrankheiten nach HEYDE keine Peptidasen bei Schizophrenie und seniler Dementia, wohl aber bei Paralyse, Hirntumoren. Nachweis von Aminopolypeptidase bei Paralyse HEYDE **37**).

3) Blutkörper.

§ 508. In der Berichtszeit sind vor allem die Leukocyten näher auf ihr Proteasensystem hin untersucht worden. Hier wie bei den folgenden Ausführungen über die Enzyme zelliger Gebilde resp. der Organe müssen wir nochmals betonen, daß die Arbeiten sich ihrer Absicht nach ganz betont mit den Proteinasen beschäftigt haben. Die Angaben über die begleitenden Peptidasen sind sozusagen Nebenbefunde, soweit sie sich nicht direkt auf die Trennung und Charakterisirung der einzelnen Peptidasen beziehen und als solche erwähnt sind. Es ist eben ganz selbstverständlich, daß jede Zelle in ihrem Proteasensystem neben den Proteinasen auch die zugehörigen Peptidasen besitzt.

---

29) ***K. Boshamer,*** Peptidasenhaush. im Verl. akuter Pankreasnecrose. Klin. Ws. **1929**, 1957. — 30) ***H. Pfeiffer, F. Standenath,*** Peptidasenhaush. des Menschen etc. Fermentforsch., **8**, 327 (1925); Zs. exp. Med., **51**, 234 (1926). — 31) ***H. Pfeiffer,*** Peptidasenhaush. (Zusammenf.). Wien. Arch. inn. Med., **15**, 209 (1928). S.A. (Lit.). — 32) ***H. Pfeiffer, F. Standenath, R. Weeber,*** Peptidasenhaush. etc. Zs. exp. Med., **47**, 386 (1925); Zs. ges. Neurol., **98**, 297, **105**, 224 (1925/6). — 33) ***R. Kraft,*** Peptidasebest. bei chirurg. Erkrank. D. Zs. Chir., **208**, 126 (1928); BPh **47**, 155. — 34) ***F. Sturm,*** Tierexp. Peptidasenunters. Zs. exp. Med., **66**, 506 (1929). — 35) ***F. Standenath,*** Z. K. der Antifermente (Peptidase). Fermentforsch., **9**, 9 (1926). — 36) ***W. Heyde,*** Proteol. Ferm. im Liquor cerebr. Verh. Phys. Med. Ges. Würzburg, **55**, 82 (1930); BPh **57**, 328. — 37) ***W. Heyde,*** Proteasen der Cer.-Sp.-Flüß. Zs. ges. Neurol., **138**, 536 (1932); BPh **69**, 148.

Bei den Leukocyten sei also hier nur kurz vorweggenommen, daß bei ihnen zwei Typen vorkommen. Die polymorphkernigen Leukocyten aus dem Knochenmark haben nach WILLSTÄTTER 38) ein System, das bis in alle Einzelheiten dem des Pankreas entspricht; d. h. sie enthalten vorwiegend eine echte Tryptase (neben wenig Kathepsin) und die dazugehörigen Peptidasen, nämlich neben den überall vorhandenen wie Dipeptidase und Amino-polypeptidase noch eine schwache tryptische Carboxy-polypeptidase. Ebenso verhalten sich nach HUSFELDT 39), 40) die Blutkörper bei myeloider Leukämie. Dagegen enthalten die Lymphocyten das übliche Proteasen-system der Organe (KLEINMANN 41)), also Kathepsin und damit auch die ihm zugeordnete Carboxy-polypeptidase. Angaben über Di- und Amino-polypeptidase in Leukocyten bei HUSFELDT, Dipeptidase schwach, Nachweis in sehr kleinen Mengen menschlicher Leukocyten OELKERS 42).

4) Organe, Tumoren.

§ 509. Hier gilt mit gleicher Schärfe das oben Gesagte: die meisten casuistischen Angaben befassen sich mit dem Eiweißabbau als Ganzem, wir müssen also auch hier weitgehend auf den XV. Hauptteil verweisen. Bei den Organen fehlt die Tryptase als autochthones Enzym wohl überall, und das Kathepsin beherrscht das Feld; somit entspricht auch das Peptidasen-system diesem Typus: es finden sich überall Dipeptidase und Amino-polypeptidase, die durch Adsorption (Tonerde $C\gamma$) abgetrennt werden; sowie die katheptische Carboxy-polypeptidase, die zuerst beim Kathepsin bleibt und dann von diesem getrennt werden kann (WALDSCHMIDT-LEITZ 43)). Im Allgemeinen zeigen die Systeme aller Organzellen dasselbe Bild; eine bisher nicht aufgeklärte Ausnahme bildet die Magenschleimhaut, deren Peptidasen WILLSTÄTTER und BAMANN 44) nicht wie sonst in Dipeptidasen und Polypeptidasen aufteilen konnten.

Das Glycyl-tryptophan spaltende Ferment fand STANDENATH 45) in allen Organen, und unterschied es richtig — im Gegensatz zu der früheren Verwirrung — von dem Pepton (aus Seide) zerlegenden Ferment, das eben zum Kathepsin gehört; dieses zeigt ein ph-Optimum von ca. 5, die Peptidase von 7—8,5. Die Peptidase ist ungiftig. — Glycyl-glycin-spaltung nach MALOWAN 46) am stärksten Niere und Darm, weniger Leber, Tumor garnicht (Hemmung??), ähnlich bei Leucyl-glycin. — Bei Skorbut keine Veränderung (47).

Magenschleimhaut. Die Peptidasen sind im Anschluß an die Forschungen über Kathepsin von WILLSTÄTTER und BAMANN 44) zuerst genauer untersucht worden. Eine sehr eingehende Untersuchung haben LINDERSTRØM-LANG c.s. 51a) vorgenommen. Das Hauptergebnis ist, daß die Peptidase von der Oberfläche ab zur Muscularis mucosae zunimmt, dann steil abfällt. In allen Gebieten des Magens sind die Hauptzellen die Träger der Peptidase (Näheres bei Pepsin, § 559).

Im **Duodenum** sind nach LINDERSTRØM-LANG die Zylinderzellen die Träger der Peptidase, die Becherzellen wenig oder garnicht. Auch die BRUNNER-Zellen enthalten Peptidase. Speicheldrüse enthält Peptidase, die vielleicht leukocytären Ursprungs ist (WILLSTÄTTER c.s., l. c. 19).

38) ***R. Willstätter, E. Bamann, M. Rohdewald,*** Trypsin der farbl. Blutk. Zs. phys. Chem., **185**, 267, **188**, 107, **204**, 181 (1929/32). S.A. — 39) ***E. Husfeldt,*** Prot. Enz. in den Leukoc. des Menschen. Zs. phys. Chem., **194**, 137 (1931). — 40) ***E. Husfeldt,*** Proteol. Enz. der Leukoc. Bibl. Laeg., **125**, 90 (1933) (dän.); BPh **85**, 636. — 41) ***H. Kleinmann, G. Scharr,*** Proteol. Ferm. in den weißen Blutk. etc. Bioch. Zs., **251**, 275 (1932). — 42) ***H. A. Oelkers, H. Fischgold,*** Proteol. Ferm. menschl. weißer Blutk. Klin. Ws., **10**, I, 205 (1931). — 43) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner c.s.,*** Proteol. System in tier. Organen. Zs. phys. Chem., **188**, 17 (1930). — 44) ***R. Willstätter, E. Bamann,*** Proteasen der Magenschleimhaut. Zs. phys. Chem., **180**, 127 (1928). — 45) ***F. Standenath,*** Gewebe- und Serumproteasen bzw. Peptidasen. Fermentforsch., **9**, 18, 41 (1926). — 46) ***S. L. Malowan,*** Peptidspalt. durch norm. und Tumorgew. Zs. Krebsf., **37**, 277 (1932). — 47) ***L. Pozzi,*** Enz. proteol. n. organi di cavie scorbut. Atti Acc. Linc. (6), **17**, 583 (1933).

Niere zeichnet sich dadurch aus, daß sie als einziges normales Organ besondere Peptidasen enthält, nämlich die „Sulfopeptidase" Otani's **47a)**, die Naphtalinsulfo-glycyl-glycin und Ähnliches spaltet, sowie die Dehydro-peptidase von Bergmann **49a)**. Sie steht also anscheinend irgendwie mit der Dehydrirung vor der Desaminirung in Verbindung. Auch in gefaultem Pankreas findet sich Dehydro-peptidase, wahrscheinlich aus Bakterien stammend. Dipeptidase soll nach Abderhalden **48)** fehlen, während sie von Grassmann c.s. **48a)** wiederholt nachgewiesen wurde. Die Dipeptidase der Niere zeichnet sich nach Grassmann sogar durch besonders hohe Substrataffinität aus; ihr ausgesprochenes Spaltungsvermögen für sonst schwer spaltbare Substrate (Asparagylpeptide etc.) wird von Grassmann mit der physiologischen Bedeutung der Niere für den Endabbau der Eiweißkörper in Verbindung gebracht. — Carboxy-polypeptidase, „tryptische" und „ereptische Acylasen" wies Abderhalden **48)** nach. — Bei Vergiftung (Uran) in den Nieren keine Veränderung, Zunahme in Muskel und Blut (Murata **49)**).

Nebenniere (Pferd): Dipeptidase und „ereptische Acylase", Abderhalden **48)**.

Milz. Nach Waldschmidt-Leitz **50)** reich an Peptidasen; nach Abderhalden **48)** fehlt Carboxy-polypeptidase und „tryptische Acylase", der Preß-saft enthält nur eine „Peptonase", sowie Dipeptidase und etwas „ereptische Acylase". — Gehirn: Dipeptidase Heyde **51)**. — Herz (Pferd): Dipeptidase Abderhalden **48)**. — Lunge (Pferd): Dipeptidase, „ereptische Acylase", „Peptonase"; „tryptische Acylase" und Carboxy-polypeptidase fehlen **(48)**. Polypeptid-spaltung in der durchströmten Lunge Binet **52)**. Schlangenmuskel: angeblich zwei verschiedene Dipeptidasen Sato **53)**.

Hühnerembryonen: Extrakt enthält Dipeptidase und Amino-polypeptidase, die für die wachstumsfördernde Wirkung bedeutungsvoll sein sollen (Borger **54)**). Auch im Hühnerei finden sich Dipeptidasen nur in den Extrakten aus dem Embryo und Dottersack (Ammon **55)**). Dagegen findet Rimington **56)** zwei Peptidasen im Eiweiß, ph = 5,5 resp. 7—8.

Bei Fröschen (*Rana temporaria*) hat Doljanski **57)** die Dipeptidase-wirkung vor, während und nach der Metamorphose gleich stark befunden; Extremitäten enthalten weniger als die Leiber.

Tumoren. Bei Tumortieren ist der Gehalt an Dipeptidase nach Kleinmann **58)** und Maschmann **59)** in den Organen normal oder leicht erhöht; im nekrotischen Anteil der Tumoren geht der Gehalt auf ca. $^1/_3$ zurück. Dipeptidase nach Malowan (l. c. 46) im Tumorgewebe gleich oder geringer als in der Norm, am ehesten dem embryonalen Gewebe ähnlich. Tumor und embryonale Niere spalten z. B. Glycyl-glycin beinahe garnicht (Hemmung??).

47a) ***S. Otani,*** Sulfopeptidase. Acta Scholae Med. Kyoto, **17,** 163—196 (1934); BPh **85,** 165. — 48) ***E. Abderhalden, E. Schwab,*** Wirk.-Ber. der während der Autolyse ... in Ersch. tret. Ferm. Fermentforsch., **14,** 43 (1933). S.A. — 48a) ***W. Graßmann c.s.,*** Z. Frage der Einheitl. der Dipeptidase. Zs. phys. Chem., **186,** 26 (1929); Bioch. Zs., **278,** 452 (1934). S.A. — 49) ***S. Murata,*** Change in the enzymes ... in the case of impaired renal funct. Jap. Jl. Gastroenterol., **7,** 69 (1935); BPh **91,** 412. — 49a) ***M. Bergmann, H. Schleich,*** Enzym. Spalt. dehydr. Peptide. Zs. phys. Chem., **205,** 65, **207,** 235 (1932). — 50) ***E. Waldschmidt-Leitz, W. Deutsch,*** Prot. Enz. der Milz. Zs. phys. Chem., **167,** 285 (1927). — 51) ***W. Heyde,*** Unt. über Gehirnferm. Habil. Schr. Würzburg 1932. — 51a) ***K. Linderstrøm-Lang, H. Holter (A. Søeborg Ohlsen),*** Verteil. der Peptidase in der Schleimh. von Magen etc. Zs. phys. Chem., **226,** 177, **227,** 1 (1934). S.A. — 52) ***L. Binet, M. Burstein,*** Act. du poumon sur les polypept. Soc. Biol., **119,** 1028 (1935); BPh **90,** 30. — 53) ***M. Sato,*** Dipeptidase in extr. of muscle etc. Mem. Fac. Taihoku, **9, 1** (1933); BPh **75,** 348. — 54) ***G. Borger, T. Peters,*** Enzyme des Extr. aus Hühnerembr. Zs. phys. Chem., **214,** 91 (1933). — 55) ***R. Ammon, E. Schütte,*** Verh. von Enz. im Hühnerei währ. der Bebrüt. Bioch. Zs., **275,** 216 (1935). S.A. — 56) ***E. van Manen, Cl. Rimington,*** Enz. activ. of egg-white. Onderstepoort Vet. Sci., **5,** 329 (1935); BPh **92,** 323. — 57) ***V. Doljanski,*** Proteol. Ferm. der Rana temp. etc. Arch. Path. (Virchow), **291,** 418 (1933). — 58) ***H. Kleinmann, F. Werr,*** Proteol. Ferm. in ... Geschwülsten. Bioch. Zs., **241,** 108, 140, 181 (1931). — 59) ***E. Maschmann, E. Helmert,*** Kathepsin und Peptidasen in carcin.... Tieren. Zs. phys. Chem., **216,** 161 (1933). S.A.

Mit dem Altern des Tumors (WALDSCHMIDT-LEITZ 60)) verändern sich die Peptidasen nicht deutlich, im Gegensatz zur Arginase (§ 439); Kathepsin nimmt ab; soweit wie meist Altern und Necrose etwa parallel gehen, stimmt dies also mit den Angaben von MASCHMANN nicht überein, wahrscheinlich herrscht hier keine bestimmte Regel vor. Bei carcinomatösem Uterus keine wesentlichen Veränderungen, Lymphknoten mehr Peptidase als normale (61).

5) Wirbellose.

§ 514. Bei den Wirbellosen entspricht im Princip das Proteasen-system dem der Gewebe der höheren Tiere, auch in ihren Verdauungssäften; es findet sich also auch das entsprechende Peptidasen-system, jedoch ist die katheptische Carboxy-polypeptidase meist noch nicht festgestellt, in dieser Beziehung erinnert das System an das der höheren und niederen Pflanzen, bei denen ebenfalls die Proteinase bisher noch nicht weiter aufgelöst werden konnte. Nur wo sich auch Tryptase findet, läßt sich auch die tryptische Carboxy-polypeptidase nachweisen, so bei *Maja* (s. u.). (Im übrigen findet sich die tryptische Carboxy-polypeptidase auch sonst, z. B. bei Hefen (vgl. UTZINO 62)). Zusammenfassende Darstellung bei KRÜGER 63). Weitere Angaben s. auch bei Proteinasen der Wirbellosen im XV. Hauptteil.

Bei der **Koralle** *Fungia* Peptidase in den Mesenterialfilamenten YONGE 64).

Vermes. Bei den Blutegeln *Hirudo* und *Haemopis* fanden GRAETZ c.s. 65) keine Proteinasen, aber alle 3 Peptidasen.

Mollusca. Eingehende Untersuchung der Muschel *Murex anguliferus Lamk.* MANSOUR-BEK 66): Peptidasen in allen Drüsen des Verdauungsapparates; im Magensaft und den Speicheldrüsen fehlt Carboxy polypeptidase. — Bei *Helix* konnte MANSOUR-BEK 67) ebenfalls die verschiedenen Peptidasen trennen. Amino-polypeptidase im Kropfsaft und der Mitteldarmdrüse ROSÉN 68). Weitere Befunde bei Muscheln KRÜGER 69), bei Pulmonaten GRAETZ 70). Bei Cephalopoden Peptidase in der Mitteldarmdrüse (KRÜGER 69), ROMIJN 71)) (*Eledone, Sepia, Octopus*). SAWANO 72) fand bei *Polypus vulgaris Lamk.* Peptidasen aller Art im Saft der hinteren Speicheldrüse, Kropf, Pankreas, Darm, Leber; Dipeptidasen in allen Organen.

Arthropoda. Bei verschiedenen Crustaceen Dipeptidase KRÜGER 69). Genauere Untersuchung des Magensaftes von *Astacus*, Befund von Di- und Amino-polypeptidase KRÜGER und GRAETZ 73). Eingehende exakte Untersuchung der Verdauungssekrete von *Maja squinado Latr.* durch MANSOUR-BEK 74), 74a). Die gesamte Verdauung findet im Magen statt, nur die Mitteldarmdrüse gibt Proteasen ab. Alle Peptidasen nachgewiesen und getrennt.

Tunicata. Nachweis von Peptidasen bei *Ciona* KRÜGER 69) (Di- und Polypeptidase).

---

60) ***E. Waldschmidt-Leitz, E. McDonald,*** Enz. in Tumoren, Zs. phys. Chem., **219,** 115 (1933). S.A. — 61) ***K. Nakahori,*** Ferm. in the uterine cancer. Jap. Jl. Obst., **18,** 120 (1935); BPh **91,** 87. — 62) ***S. Utzino,*** Wirk. der proteol. Ferm. auf . . . Polyp. Jl. of Biochem., **9,** 453 (1928). — 63) ***P. Krüger,*** Vergl. Ferm.-Stoffw. der niederen Tiere. Erg. Phys., **35,** 538 (1933). S.A. — 64) ***C. M. Yonge,*** Physiol. of corals. II. Dig. Enz. Sci. Rep. G. Barrier Reef Exped., **1,** 13 (1930); cit. nach 63). — 65) ***E. Graetz, H. Autrum,*** Ferm. der Eiweißverd. bei Hirudo etc., Zs. vgl. Phys., **22,** 273 (1935); BPh **89,** 522. — 66) ***J. J. Mansour-Bek,*** Proteol. Enz. von Murex etc. Zs. vgl. Phys., **20,** 343 (1934). S.A. — 67) ***J. J. Mansour-Bek, G. Hörstadius-Kjellström,*** Adsorpt. Vers. mit den Proteasen von Maja etc. Zool. Anz. Suppl., **5,** 205 (1931); cit. nach 63). — 68) ***B. Rosén,*** Proteinase und Amino-polyp. . . . von Helix. Zs. vgl. Phys., **21,** 176 (1934); BPh **85,** 273. — 69) ***P. Krüger,*** Verdau. Ferm. der Wirbellosen. Sitzber. Berl. Akad., **1929,** Nr. 26, S. 548. S.A. — 70) ***E. Graetz,*** Verdau.-Ferm. im Kropfsaft einheim. Pulmonaten. Zs. phys. Chem., **180,** 305 (1928). — 71) ***C. Romijn,*** Verdau. Enz. bei Cephalop. Acta brev. Neerl. Phys., **5,** 14 (1935). — 72) ***E. Sawano,*** Proteol. enz. in Polypus etc. Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daig. **B, 2,** 101 (1935); BPh **93,** 404. — 73) ***P. Krüger, E. Graetz,*** Eiweißferm. des Flußkrebses. Zs. phys. Chem., **166,** 128 (1927); Zool. Jb., **45,** 463 (1928). S.A. — 74) ***J. J. Mansour-Bek,*** Proteol. Enz. von Maja etc. Proc. Roy. Acad. Amsterdam. **33,** 858 (1930). — 74a) ***J. J. Mansour-Bek,*** Proteol. Enz. von Maja etc. Zs. vgl. Phys., **17,** 153 (1932). S.A.

Eier von Wirbellosen. Unbefruchtete Eier von *Urechis caupo* und *Dendraster excentricus* zeigen nach LINDERSTRØM-LANG 75) eine Peptidase-wirkung je Ei und Stunde von ca. 1×10^{-3} mg Alanyl-glycin, *Dendraster* ca. doppelt so viel. Unmittelbar nach der Befruchtung Absinken, dann Anstieg nach 3—6^h, nach 20^h wieder Abnahme. Die Verteilung hat bei *Psammechinus* PHILIPSON 75a) untersucht. Bei gleichen Tieren gleiche Aktivität der Eier, bei verschiedenen große Unterschiede. Nach dem Zentrifugiren ist der schwerere Anteil 5mal so reich an Peptidase. Zusammenhang mit den Mitochondrien unsicher. Nach HOLTER 75b) findet sich in den Eiern mariner Avertebraten (*Arbacia, Echinarachnius, Chaetopterus*) die P. ausschließlich in der hyalinen Grundsubstanz (Matrix) des Cytoplasma, nicht in den Granula.

C. Peptidasen der Pflanzen.

§ 515. Zu diesem Thema liegt biologisch wichtiges Material zur Ergänzung der an sich schon spärlichen Angaben im H.W. sehr wenig vor. So wichtig die Bearbeitung gerade der pflanzlichen Peptidasen und vor allem der der Hefen in chemischer Beziehung geworden ist, so unwesentlich sind die neueren Befunde über ihr Vorkommen und ihre Bedeutung. Auch hier mußte der von COHNHEIM für sein Darm-erepsin aufgestellte und von VINES für das pflanzliche Erepsin acceptirte Standpunkt überwunden werden, daß die Spaltung von Peptonen der Erepsingruppe zuzuschreiben ist, während sie in Wirklichkeit — wenn es keine besondere „Peptonase" gibt — den Proteinasen zukommt, wie für die pflanzlichen „Erepsine" WILLSTÄTTER 76) betont hat. So sind von den älteren Angaben des H.W. nur solche noch zu verwerten, die an definirten Polypeptiden gewonnen sind (z. B. *l. c. 530, 531*).

Dass die pflanzlichen Peptidasen sich chemisch resp. enzymtypisch z. T. anders verhalten, daß z. B. z. T. die Aufteilung in die Einzelgruppen noch nicht möglich ist, haben wir berichtet. So ist z. B. die von der Proteinase abgetrennte Peptidase aus Grünmalz nach LINDERSTRØM-LANG 77) bisher nicht in Di- und Polypeptidasen auflösbar, während die Hefe umgekehrt das erste Objekt war, an dem GRASSMANN 78) die Dipeptidase und die Amino-polypeptidase trennen konnte. Die letztere befindet sich hier im Gegensatz zu der tierischen in der Proteinase-fraktion. Außerdem kommt nach dem bisherigen Stand des Wissens die dem Kathepsin beigeordnete und von ihm trennbare „katheptische Carboxy-polypeptidase" — außer vielleicht nach einer kurzen Angabe von GRASSMANN (l. c. 89) in Hefe — in Pflanzen überhaupt nicht vor (WALDSCHMIDT-LEITZ c.s. 79)). Aber über die biologische Tragweite solcher Unterschiede wissen wir bisher garnichts.

Davon also abgesehen wissen wir heute nun nach sehr langen und tiefgreifenden Wirrnissen, daß alle Pflanzen — außer einigen auch hier wieder atypischen Bakterien — ein Protease-system besitzen, das besteht aus einer Proteinase, die dem tierischen Zellferment Kathepsin zum Verwechseln ähnlich ist, und je nachdem Papain oder Hefentrypsin oder Samenprotease genannt wird, und den überall vorhandenen Peptidasen, vielleicht um ein Geringes abgewandelt gegenüber den tierischen.

---

75) ***K. Linderstrøm-Lang,*** Peptidasegehalt einiger mariner Invert. Zs. phys. Chem., **215**, 167 (1933). S.A.; (engl.) C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **19**, H. 13 (1933). — 75a) ***T. Philipson,*** Peptidase in den Eiern von Psammechinus etc. Zs. phys. Chem., **223**, 119; (engl.) C.R. Trav. Lab. Carlsberg, **20**, Nr. 4, S. 1 (1934). S.A. — 75b) ***H. Holter,*** Localis. of peptidase in marine ova. Jl. of Cell. Phys., **8**, 179 (1936). S.A. — 76) ***R. Willstätter, W. Graßmann, O. Ambros,*** Erept. Kompon. einiger Pflanzenproteasen. Zs. phys. Chem., **152**, 160 (1926). S.A. — 77) ***K. Linderstrøm-Lang, M. Sato,*** Determ. and sep. of the proteol. enz. in green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **17**, H. 17 (1929); Zs. phys. Chem., **184**, 83 (1929). S.A. — 78) ***W. Graßmann,*** Dipeptidase und Polyp. der Hefe. Zs. phys. Chem., **167**, 202 (1927). S.A. — 79) ***E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner c.s.,*** Proteol. System in tier. Organen. Zs. phys. Chem., **188**, 17 (1930). S.A.

An dem ganz allgemeinen Vorkommen dieses Apparates ist ja garnicht zu zweifeln, und so hat das bloße Aufsuchen der Peptidasen garkein Interesse. Die Beziehungen zum Eiweiß-stoffwechsel andererseits sind immer betont an der Proteinase studirt worden, und es wäre ganz unzweckmäßig, diese künstlich zu trennen und die wenigen nebenherlaufenden Angaben über Peptidasen herauszusuchen. So muß denn hier wie bei den tierischen Peptidasen auf die Behandlung der Proteinase im XV. Hauptteil verwiesen werden. Hier interessirt allgemein betrachtet nur die Tatsache, daß in vielen pflanzlichen Geweben, in denen kein erheblicher Eiweiß-stoffwechsel stattfindet, die Peptidasen nur sehr spärlich vorhanden sind. Sie werden hauptsächlich dort zu finden sein, wo zum Zwecke des Wachstums starker Abbau und Umbau von Eiweiß über die tiefsten Stufen nötig ist: in Samen und bei Kryptogamen.

So hat WILLSTÄTTER 76) sowohl im käuflichen Papain wie in frischen Blättern von *Carica papaya* die Spaltung von Leucyl-glycin ganz vermißt, in Kürbisfrüchten war sie sehr schwach, aber deutlich; ebenso verhielt sich frische Ananas, während das Trockenpräparat Bromelin ohne Wirkung war. Im frischen Saft von Früchten der *Carica* hatte auch IWANOW (*l. c. 526*) kein „Erepsin" gefunden. Später haben allerdings AMBROS c.s. 80) auch im frischen Fruchtsaft der *Carica* ebenso wie im Kürbis reichlicher Peptidasen gefunden, sie waren durch HCN-Hemmung überdeckt, ließen sich aber adsorptiv abtrennen. Eine Dipeptidase kommt überall vor. Spaltung eines Tetrapeptids durch Papain-HCN gibt NAKASHIMA (§ 470, l. c. 140) an.

Nach LÜERS 81) ist die Dipeptidase des Malzes der der Hefe sehr ähnlich; auch LINDERSTRØM-LANG 82) nahm dies zunächst an, fand aber später (l. c. 77) ein höheres ph-Optimum (8,4) und schließt auf zwei verschiedene Dipeptidasen oder vielmehr Peptidasen überhaupt, da eine Trennung von der Polypeptidase hier bisher nicht gelungen ist.

Die Verteilung der Peptidasen in der keimenden Gerste hat LINDERSTRØM-LANG 83) genauer untersucht. Sie finden sich im Scutellum, dem Blattkeim und in den Wurzelanlagen, der Rest des Korns ist so gut wie frei. Während wie überall die Enzyme des Scutellum der Aufschließung der Nährstoffreserven dienen, haben die Enzyme des Proteinstoffwechsels in den wachsenden Teilen wohl Beziehungen zum Wachstum selbst. In den Wurzelkeimen wird die Aktivität der Peptidasen durch das Längenwachstum bestimmt, die Peptidase ist am reichlichsten etwa 0,8 mm von der Spitze. Die Wirksamkeit ist für Leucyl-glycin und Alanyl-glycin verschieden, die auf Leucyl-glycin fällt nach dem ruhenden Wurzelabschnitt schneller, fast auf Null, ab. Beim Blatt steigt die Aktivität von der Spitze zur Basis. Die Enzyme blieben bei diesen Versuchen in situ. Dauernde starke Steigerung im Scutellum von Weizen PETT 84). — Albina-Mutanten der Gerste (weiße Pflanzen) zeigen sowohl im Embryo wie im Scutellum eine erheblich größere Aktivität als normale (v. EULER 85)); vielleicht mangelt ein Aktivator. Bei erhitzten und dann gekeimten Gerstenkörnern war der Gehalt anfangs etwas niedriger, am 6. Keimungstage aber normal (v. EULER 86)).

In Blüten finden sich nur schwache Peptidasen. Hier herrscht nach GRASSMANN 87) die oxydative Desaminirung an den Peptiden selbst, ohne vorherige Spaltung, vor.

Kryptogamen. Arbeiten biologischen Zieles liegen nicht vor. So sei denn nur die grundlegend wichtige Tatsache hier nochmals rekapitulirt, daß wir für die Peptidasen der Hefe ihre präparative Reindarstellung durch Trennung von der Proteinase WILL-

80) ***O. Ambros, A. Harteneck,*** Proteasen höherer Pflanzen. Zs. phys. Chem., **184,** 93 (1929). — 81) ***H. Lüers, L. Malsch,*** Proteol. Enz. des Malzes. Ws. Brau., **46,** H. 28/9 (1929). S.A. — 82) ***C. K. Mill, K. Linderstrøm-Lang,*** Proteol. enz. in green malt. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **17,** H. 10 (1929). S.A. — 83) ***K. Linderstrøm-Lang, H. Holter,*** Peptidase-Verteilung in Wurzel etc. des Malzkornes. Zs. phys. Chem., **204,** 15. S.A.; (engl.) C. R. Trav. Lab. Carlsberg, **19,** H. 6 (1932). — 84) ***L. B. Pett,*** Distrib. of enz. in . . . wheat seeds. Biochem. Jl., **29,** 1898 (1935). — 85) ***H. v. Euler, B. Sjöman,*** Dipeptid-Spalt. in keim. Chlorophyll-Mutanten der Gerste. Bioch. Zs., **264,** 237 (1933). — 86) ***H. v. Euler, G. Günther,*** Enzymwirk. und Enzymbild. in leb. Zellen. Zs. phys. Chem., **220,** 69 (1933). — 87) ***W. Graßmann, H. Bayerle,*** Abbau der Aminosäuren in den Blüten. Bioch. Zs., **268,** 220 (1934). S.A.

STÄTTER und GRASSMANN 88) verdanken, und daß letzterer bald darauf (l. c. 78) an diesem Objekt zuerst die weitere Aufteilung des Peptidasen-systems vornehmen konnte; indem er aus der Fraktion „Proteinase" noch die Amino-polypeptidase abtrennen konnte. Daneben ist noch eine sehr schwache und unbeständige Carboxy-polypeptidase vorhanden (GRASSMANN 89)).

Die Peptidasen von *Aspergillus oryzae* entsprechen anscheinend völlig denen der Hefe (GRASSMANN 90)), die von *Aspergillus parasiticus* denen des Verdauungstraktes der Wirbeltiere (JOHNSON und PETERSON 94)).

Sulfopeptidase fand H. OTANI 91) in *Aspergillus niger* und *oryzae*, weiterhin in *Mucor, Rhizopus, Penicillium, Cladosporium herbarum, Botrytis stephanoderis, Monascus purpureus.*

Bei **Bakterien** liegen nur wenige Angaben vor. VIRTANEN 92) fand Dipeptidasen in *Bacillus fluorescens liquef.*, die erst aus der Trockenkultur extrahirt werden können. GORBACH 93) fand Dipeptidase und Polypeptidase in *Bacillus pyocyaneus*; ph-Optimum etwas alkalischer (8,4) als bei Hefe; ferner fand er Dipeptidase in dem „Acidproteolyten" *Mammococcus Gorini* mit einem optimalen ph von 4,8; bei 7,5 kaum noch Wirkung. In Übereinstimmung mit VIRTANEN 92) fand GORBACH 95) bei *Bac. fluorescens* die P. ausschließlich in den Leibern, nicht in den Kulturfiltraten. Aus den Leibern gehen sie durch Autolyse in Lösung. In dieser sind sie an sehr hochmolekulare Symplexe gebunden, da sie durch Cellophan nicht filtriren (Methode GORBACH 96)). Er nimmt wohl mit Recht an, daß eben diese sehr hohen Symplexe die lebende Zellwand nicht passiren können; es sind wohl eben Desmo-enzyme; sie entsprechen in bezug auf Arten wie auf opt. ph denen des *Bac. pyocyaneus*; sie sind sehr unbeständig, nach 1 Monat 50 % Wirkungsverlust (95)).

Dehydropeptidase in Fäulnis-bakterien BERGMANN (l. c. 47).

---

88) ***R. Willstätter, W. Graßmann,*** Proteasen der Hefe. Zs. phys. Chem., **158,** 250 (1926). S.A. — 89) ***W. Graßmann,*** Proteolyt. Enz. Erg. Enzymforsch. I, S. 149 (1932). — 90) ***W. Graßmann, H. Schleich,*** (Peptidasen von Aspergillus). Erg. Enzymforsch. I, S. 149 (1932); ***W. Graßmann,*** Habil. Schr. München 1928, S. 107. — 91) ***H. Otani,*** Sulfopeptidase der Pilze. Acta Scholae Med. Kyoto, **17,** 243—287 (1934); BPh **85,** 415. — 92) ***A. I. Virtanen, J. Tarnanen,*** Proteol. Enzymsystem der Gelatine verflüss. Bakt. Naturw. **1931,** 397. — 93) ***G. Gorbach,*** Z. K. der Bakterienproteasen. Arch. Mikrobiol., **1,** 537 (1930), **6,** 362 (1935). S.A. — 94) ***M. J. Johnson, W. H. Peterson,*** Peptidase syst. of asp. parasiticus. Jl. of Biol. Chem., **112,** 25 (1935). — 95) ***G. Gorbach, E. Pirch,*** Sekretion etc. der Bakterienproteasen. Enzymol., **1,** H. 3 (1936). — 96) ***G. Gorbach, K. Nitsche,*** Hochdruckfiltrat. mit Cellophan als Mittel zur Enzymreinig. etc. Bioch. Zs., **281,** 306 (1935).

2259